



Etude des étapes précoces de la mécanoperception chez le peuplier : approches biomécanique et moléculaire

Ludovic Martin

► To cite this version:

Ludovic Martin. Etude des étapes précoces de la mécanoperception chez le peuplier : approches biomécanique et moléculaire. Biologie végétale. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II; Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2009. Français. NNT : 2009CLF21931 . tel-00725532

HAL Id: tel-00725532

<https://theses.hal.science/tel-00725532>

Submitted on 27 Aug 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
N° d'ordre 500

Thèse

Présentée à l'Université Blaise Pascal
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE
(Spécialité : Physiologie et Biologie Moléculaire Végétales)

Soutenue le 12 juin 2009

Ludovic MARTIN

**Etude des étapes précoces de la
mécanoperception chez le peuplier:
approches biomécanique et moléculaire**

Rapporteurs : Dr. Meriem FOURNIER, UMR 1092 LERFOB, Nancy
Dr. Jan TRAAS, UMR 5667 RDP, Lyon

Examineurs : Dr. Marie-Béatrice BOGEAT-TRIBOULOT, UMR 1137 EEF, Nancy
Dr. Catherine COUTAND, UMR 547 PIAF, Clermont-Ferrand
Pr. Jean-Louis JULIEN, UMR 547 PIAF, Clermont-Ferrand
Dr. Nathalie LEBLANC-FOURNIER, UMR 547 PIAF, Clermont-Ferrand

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur Jean-Louis Julien de m'avoir accueilli au sein de l'UMR PIAF et d'avoir été mon « chef » pendant toutes ces années. Merci pour tous ces surnoms que tu m'as donné et pour tous tes conseils judicieux. Je remercie également mes deux co-encadrantes Nathalie Leblanc-Fournier et Catherine Coutand pour tout ce qu'elles m'ont appris dans leurs domaines de connaissance respectifs. Merci à tous les trois pour avoir su me soutenir et me remotiver quand il le fallait et pour toute votre aide dans la rédaction de ce manuscrit.

Merci à Madame Meriem Fournier et Monsieur Jan Traas de me faire l'honneur de juger ce travail et d'en être les rapporteurs. J'adresse également mes remerciements à Madame Marie-Béatrice Bogeat-Triboulot d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Un grand merci également aux membres de mon comité de thèse, Marie-Béatrice Bogeat-Triboulot, Yoël Forterre, Gilles Pilate et Annabelle Desjardin pour leurs conseils et pour m'avoir permis de prendre le recul nécessaire à la bonne avancée de mes travaux.

Je voudrais exprimer toute ma reconnaissance aux membres de l'équipe de Gilles Pilate au sein de l'Unité Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières de l'INRA d'Orléans de m'avoir permis d'apprendre la technique de transformation génétique du peuplier. Un grand merci à tous.

Je tiens également à remercier tous les membres du PIAF anciens ou présents qui m'ont aidé durant toutes ces années. Un grand merci à Bruno pour ses conseils. Merci à Sylvaine pour tous les broyages de tige qu'elle a fait pour moi, à Madame Faure pour son aide en culture *in vitro* à mon arrivée. Je remercie également Norbert et tous les techniciens de l'INRA pour leur aide. Je tiens aussi à exprimer tous mes remerciements à Nicole pour son travail de cytologie, pour sa gentillesse et sa disponibilité. Un immense merci à Christelle pour s'être si bien occupé de mes petits peupliers. Je sais que je peux partir l'esprit tranquille,

ils sont entre de bonnes mains. Je souhaiterais aussi remercier les différentes stagiaires, Emilie (mon petit padawan), Daphné et Caroline qui ont apporté leur pierre à l'édifice.

C'est avec beaucoup de reconnaissance et de gratitude que je remercie Isabelle Jouan et Nathalie Leblanc-Fournier pour leur disponibilité et leur aide dans les différents enseignements que j'ai effectué.

Merci à tous les piafounets de la fac pour tous ces grands moments au coin café. Dès que m'arrêtais, je savais que ça allait être ma fête à chaque fois... Mais, je suis bien obligé de reconnaître que vous allez tous beaucoup me manquer. Un grand merci à Boris, Aurélie, Catherine, Agnès, Mélanie, Nicole, Jing, Stéphane, Hossam, Khaoula, Christelle, Patricia, Jean-Stéphane, Jérôme, Jean-Louis, Sylvaine, Delphine, Johann. Merci également aux deux Julie du labo d'à côté pour toutes les pauses cloppes pendant lesquelles je ne fumais pas. Franchement, sans vous tous, ces années n'auraient sûrement pas été aussi inoubliables qu'elles le sont. Merci enfin à Valérie de m'avoir accepté dans son bureau pendant toute ma période de rédaction.

Je souhaiterais adresser également toute mon affection à ma copine temporaire de bureau Anaïs. Merci d'avoir toujours été là pour moi, merci également pour ta franchise et pour tout ce qui fait que tu es quelqu'un d'exceptionnel.

Enfin, je remercie chaleureusement ma famille ainsi que tous mes amis, en particulier Cyril (alias Bibi), Manu, Eléonore et tous les petits capétiens pour leur soutien pendant toute la durée de ma thèse.

Je ne saurais jamais assez tous vous remercier.

Spécial dédicace à tous mes petits peupliers sans qui rien n'aurait été possible !!!

Liste des abréviations

2ip :	2-isopentényladénine	EAR :	ERF-associated-amphilic repressor
ABA :	Acide abscissique	ERF :	Ethylene-response factor
ACC :	Acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique	GFP :	Green fluorescent protein
ACS :	ACC synthase	GUS :	Glucuronidase
ADN :	Acide désoxyribonucléique	H₂O₂ :	Péroxyde d'hydrogène
ADNg :	ADN génomique	Hz:	Hertz
ADNc :	ADN complémentaire	LB :	Luria Broth
AGP :	Arabino Galactan Protein	LiCl :	Chlorure de lithium
AGT :	Adénosine, Guanine et Thymidine	LVDT :	Linear Voltage Differential Transducer
ANA :	Acide Naphtalène Acétique	mmol :	Millimole
ARN :	Acide ribonucléique	MPa :	Megapascal
ARNdb :	ARN double brin	MS :	Murashige et Skoog
ARNm :	ARN messenger	MscS :	Mechanosensitive channel with Small conductance
C2H2-ZFP :	Cysteine2/Histidine2 Zinc Finger Protein	MSL :	MscS-like
CaM :	Calmoduline	NaCl :	Chlorure de sodium
CaMV 35S :	Cauliflower Mosaic Virus 35S	NaOH :	Hydroxyde de sodium
CBL:	Calcineurine-like protein	N :	Newton
Cfu :	Colony forming unit	NSpe :	Non Spécifique
Ci :	Curie	pb :	Paire de base
CML :	Calmoduline-like protéine	pHg8 :	pHellsgate 8
CPMCW :	Cytoskeleton- Plasma Membrane - Cell Wall	Pta :	Populus tremula x alba
DMSO :	Dimethyl sulfoxide	SOD :	Superoxide dismutase
EAO:	Espèces Activées de l'Oxygène	APX1 :	Ascorbate peroxydase 1
EPSPS :	5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase	QALGGH :	Glutamine-Alanine-Leucine-Glycine-Glycine-Histidine
		RGD :	Arginine-Glycine-Aspartate
		RISC :	RNAi-Induced Silencing Complex

RNAi :	RNA interference
RT-PCR :	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
TCH :	TOUCH
T-DNA :	ADN de transfert <i>d'Agrobacterium tumefaciens</i>
SDS :	Sodium Dodecyl Sulfate
Spe :	Spécifique
SSC :	Saline Sodium Citrate
STZ :	Salt-Tolerance Zinc finger
V :	Volt
WAK :	Wall Associated Kinase
XET :	Xyloglucane endotransglycosylase /hydrolase
μM :	Micromolaire

Sommaire

<i>Introduction générale</i>	1
<i>Synthèse bibliographique</i>	3
I- <u>La nature des signaux mécaniques</u>	3
1.1- Les signaux mécaniques internes	3
1.2- Les signaux mécaniques externes	4
II- <u>Bilan sur les études des réponses physiologiques des végétaux aux signaux mécaniques</u>	6
2.1- Importance des signaux mécaniques internes dans le développement et la croissance	6
2.2- Les réponses physiologiques des plantes aux signaux mécaniques externes	6
2.2.1- <i>Modification de la croissance longitudinale</i>	7
2.2.1.1- En conditions naturelles, la croissance longitudinale est augmentée chez les plantes protégées du vent	7
2.2.1.2- L'application de sollicitations mécaniques artificielles entraîne une diminution de la croissance longitudinale	8
2.2.2- <i>Modification de la croissance radiale et des caractéristiques mécaniques des tiges</i>	9
2.2.2.1- Les sollicitations mécaniques entraînent des modifications de croissance radiale des tiges	9
2.2.2.2- Modification des caractéristiques mécaniques des tissus	10
2.2.3- <i>Autres modifications physiologiques observées</i>	11
2.2.3.1- Modification de la croissance du système racinaire	11
2.2.3.2- Modification de l'allocation de la biomasse	11
2.2.3.3- Modification d'autres processus	12
2.2.4- <i>Mise en évidence d'un transfert d'informations dans les zones en croissance suite à une sollicitation mécanique</i>	12
2.2.5- <i>L'acclimatation des plantes aux sollicitations mécaniques</i>	13
III- <u>La mécanoperception</u>	15
3.1- La variable mécanique perçue	15
3.1.1- <i>Notions de théorie des poutres</i>	15
3.1.2- <i>Modèle intégratif de la mécanoperception</i>	17
3.2- Comment la cellule perçoit-elle la variable mécanique ?	18
3.2.1- <i>Les canaux mécano sensibles</i>	18
3.2.2- <i>Le continuum CPMCW (Cytosqueleton – Plasma Membrane – Cell Wall)</i>	19

IV- <u>Les acteurs cellulaires précoces</u>	22
4.1- L'intervention du calcium	22
4.1.1- <i>Les sollicitations mécaniques induisent des flux de calcium dans les cellules</i>	22
4.1.2- <i>Les protéines capables de fixer le calcium et leur implication dans les réponses aux sollicitations mécaniques</i>	23
4.2- La production d'espèces activées de l'oxygène	24
4.3- Implication de l'éthylène	25
4.4- Les gènes mécanosensibles	26
4.4.1- <i>Les xyloglucanes endotransglycosylases/hydrolases (XET)</i>	26
4.4.2- <i>Les facteurs de transcription et les protéines kinases</i>	27
V- <u>Les facteurs de transcription à doigts de zinc de type Cys2/His2 (C2H2-ZFP)</u>	29
5.1- Caractérisation et fonctionnement des protéines à doigts de zinc de type C2H2-ZFP	29
5.1.1- <i>Caractéristiques générales et classification</i>	29
5.1.2- <i>Les motifs structuraux caractéristiques des protéines C2H2-ZFP du sous-groupe C1</i>	
5.2- Rôles biologiques des protéines à doigts de zinc de type C2H2-ZFP du sous-groupe C1	31
5.2.1- <i>Un rôle important dans les processus de développement</i>	32
5.2.2- <i>Intervention dans les réponses aux stress abiotiques</i>	32
5.2.3- <i>Spécificité d'expression des différentes isoformes</i>	33
VI- <u>Objectifs de la thèse</u>	35

Résultats **37**

Chapitre 1

Caractérisation du gène PtaZFP2 et étude de son expression en réponse à une flexion et à différents stress abiotiques 37

Chapitre 2

Etude quantitative de l'effet d'une flexion transitoire sur la croissance en diamètre de jeunes peupliers et sur l'expression du gène PtaZFP2 52

Chapitre 3

Caractérisation physiologique et moléculaire de l'acclimatation des plantes à des flexions multiples 78

Chapitre 4

Production et analyse de peupliers transgéniques présentant une surexpression ou une inhibition de l'expression de PtaZFP2

102

I- Introduction

103

1.1- Les constructions permettant la surexpression

103

1.2- Les constructions permettant l'inhibition de l'expression

104

II- Matériel et méthodes

106

2.1- Réalisation des cassettes d'expression

106

2.1.1- Production des constructions de surexpression

106

2.1.2- Production des constructions pX7RNAi

107

2.1.3- Production de la construction pHg8 RNAi

107

2.2- Transformation d'*Agrobacterium tumefaciens*

108

2.3- Transformation génétique du peuplier

108

2.4- Criblage des plantes transgéniques

109

2.4.1- Criblage d'expression sur les lignées transformées avec le vecteur PMDC7

109

2.4.2- Criblage des lignées recombinantes transformées avec le vecteur pX7

110

2.4.3- Détermination du nombre de copies du transgène par Southern blot

111

2.4.3.1- Extraction de l'ADN génomique et transfert sur membrane

111

2.4.3.2- Synthèse et purification des sondes

111

2.4.3.3- Préhybridation, hybridation et lavage des membranes

111

2.5- Effet du 17 β -œstradiol sur l'expression des transgènes

112

2.6- Phénotypage des lignées de surexpression

113

2.6.1- Etude de la croissance globale des plantes

113

2.6.2- Mesure de la croissance en diamètre en continu

113

2.6.3- Mesure de l'élasticité des tiges

114

2.6.4- Etude cytologique des tiges

114

III- Résultats

115

3.1- Analyse des lignées transgéniques RNAi

115

3.1.1- La lignée pHg8 RNAi Spe

115

3.1.2- Criblage des lignées pX7RNAi

115

3.2- Criblage et analyse des lignées transgéniques surexprimant PtaZFP2 et JrZFP2

116

3.2.1- Criblage des lignées régénérées

116

3.2.2- Mise au point des conditions d'induction des transgènes par les œstrogènes dans les lignées de surexpression

117

3.2.2.1- Effet de la dose de 17 β -œstradiol appliquée sur le niveau d'expression des transgènes

117

3.2.2.2- Cinétique d'expression des transgènes suite à l'ajout de 17 β -œstradiol

118

3.2.2.3- Profil d'expression des transgènes dans les différents organes

118

3.2.2.4- Mesure du niveau d'expression des transgènes dans les lignées transgéniques indépendantes

119

3.3- Analyse phénotypique des lignées de surexpression	119
3.3.1- Effet de la surexpression des transgènes sur la croissance globale des plantes	119
3.3.2- Effet de la surexpression de PtaZFP2 et JrZFP2 sur la variation de croissance en diamètre des tiges en temps réel suite à une flexion	120
3.3.3- Effet de la surexpression des transgènes sur le module d'élasticité des tiges	121
3.3.4- Effet de la surexpression des transgènes sur l'anatomie des tiges	121
3.4- Effet de la surexpression de PtaZFP2 sur l'expression de gènes candidats	122
IV- Discussion	124
4.1- Production de plantes transgéniques et efficacité des cassettes d'expression	124
4.2- Rôle de PtaZFP2 dans la croissance des plantes et dans la réponse aux sollicitations mécaniques	126
4.2.1- Un rôle important dans les premières étapes du développement ?	127
4.2.2- La surexpression de PtaZFP2 entraînerait une diminution de la croissance longitudinale et une modification des propriétés mécaniques des tiges	128
4.2.3- Un rôle dans la régulation de l'expression d'autres gènes induits suite aux sollicitations mécaniques ?	129
4.3- Perspectives	130
 <i>Discussion générale et perspectives</i>	 133
I- <u>Les réponses physiologiques et moléculaires du peuplier suite à une flexion transitoire</u>	133
1.1- Les réponses de croissance	133
1.2- Les acteurs moléculaires	134
II- <u>La déformation : paramètre physique perçu par les plantes au cours des sollicitations mécaniques</u>	135
2.1- Validation et généralité du modèle « somme des déformations » de la mécanoperception	135
2.2- Différences de sensibilité des tissus à la déformation	137
III- <u>Apport des résultats dans la compréhension de la croissance des plantes en conditions naturelles</u>	138
3.1- Effet de l'intensité de la sollicitation	138
3.2- Effet de la vitesse de sollicitation	139
3.3- Effet de la fréquence de sollicitation	139
IV- <u>Quelle est la fonction biologique de PtaZFP2 ?</u>	141
4.1- PtaZFP2 : un facteur de transcription ?	141
4.2- Rôle de PtaZFP2 dans la réponse des plantes à une flexion	142

Références bibliographiques 145

Annexes 163

Introduction Générale

Dans leur environnement, les organismes vivants sont soumis en permanence à des stimuli mécaniques qu'ils soient internes dus à la croissance et à la différenciation cellulaire ou externes tels que le vent ou le toucher. La capacité de pouvoir percevoir et répondre à ces sollicitations est essentielle pour leur survie dans un environnement mécanique fluctuant.

Chez les espèces animales vertébrées, deux appareils sensoriels mécaniques permettent de percevoir les différents signaux mécaniques. Ces perceptions mécaniques sont ensuite utilisées par le système nerveux central qui va mobiliser le système squeletto-musculaire afin de rétablir la posture et de contrôler l'équilibre général. De plus, la perception de ces signaux mécaniques ou mécanoperception contrôle directement le développement des os et des muscles afin d'acclimater le système squeletto-musculaire à ses conditions d'exercice mécanique (Moulia *et al.*, 2006).

Chez les espèces végétales, de telles capacités de perception et de réponse existent. Elles sont particulièrement importantes chez les ligneux qui peuvent atteindre une hauteur de plusieurs dizaines de mètres. Les recherches entreprises ces dernières décennies ont permis de montrer que les arbres étaient capables d'adapter continuellement la croissance de leur tronc et de leurs branches ainsi que l'ampleur de leur ancrage racinaire à leur stature et à l'intensité des perturbations mécaniques qu'ils subissent dans leur milieu de vie (Fournier *et al.*, 2005 ; Moulia *et al.*, 2006). Pour tenir debout longtemps dans un environnement mécanique variable du fait de sa propre croissance et des fluctuations météorologiques, un arbre doit pouvoir (i) mesurer mécaniquement les conséquences du vent sur sa structure et ainsi acclimater sa croissance et sa stature, et (ii) pouvoir contrôler en permanence sa posture par une motricité biomécanique active distribuée dans la structure, qui est également contrôlée par la mécanoperception.

Ma thèse s'inscrit dans une étude globale visant à comprendre le rôle des sollicitations mécaniques comme signaux intervenant dans la régulation de la croissance et de la forme des arbres et leur acclimatation à leur environnement mécanique. Elle a pour but de mieux caractériser la régulation de la mécanoperception chez les plantes.

Cette étude a débuté au moment où, chez les plantes, étaient identifiés (i) la variable mécanique perçue lors d'une flexion de tige (Coutand et Moulia, 2000), et (ii) un grand nombre de gènes impliqués précocement dans la réponse au toucher chez *Arabidopsis thaliana* (Lee *et al.*, 2005). Toutefois, très peu de données décrivant des interactions entre ces différents acteurs qui caractérisent la réponse des plantes aux sollicitations mécaniques étant

disponibles, ce travail de thèse a été réalisé en utilisant à la fois une approche biomécanique et une approche moléculaire.

Nous avons travaillé sur un hybride de peuplier (*Populus tremula x Populus alba*). Dans le cadre de notre étude, cet arbre présente de nombreux avantages techniques car il est génétiquement transformable et il peut être multiplié *in vitro*. De plus, d'un point de vue moléculaire, de nombreux outils sont disponibles, dont la séquence génomique complète de l'une des espèces de peuplier, *Populus trichocarpa* (Tuskan *et al.*, 2006). Le choix de la sollicitation mécanique s'est porté sur une flexion transitoire de la tige, afin de mimer une des actions majeures du vent en conditions naturelles.

Préalablement à la présentation des résultats obtenus au cours de ces trois années de thèse, nous allons tout d'abord faire un état des lieux des connaissances actuelles relatives à notre sujet d'étude. Dans la première partie de la synthèse bibliographique qui va suivre, nous commencerons par rappeler la nature des différents signaux mécaniques. Par la suite, nous présenterons les réponses physiologiques des plantes aux signaux mécaniques externes. Nous ferons ensuite un état des lieux des connaissances sur le phénomène de mécanoperception, au niveau biophysique, à travers la présentation de la variable mécanique perçue, puis au niveau cellulaire par la description des différents acteurs précoces. Enfin, ayant utilisé un gène de la famille des protéines à doigt de zinc de type Cys2/His2 comme marqueur moléculaire précoce de la mécanoperception chez le peuplier, nous présenterons la structure et le rôle de ce type de facteurs de transcription dans la réponse des plantes aux stress abiotiques.

Synthèse bibliographique

I- La nature des signaux mécaniques

Les signaux mécaniques perçus par les plantes sont de deux types : les signaux mécaniques internes tels que les autocontraintes durant la croissance, les autocontraintes de maturation dues à la différenciation des tissus ainsi que les contraintes induites par la variation de poids propre (Fournier *et al.*, 1994), et les signaux mécaniques externes induits notamment par le vent et les interventions humaines.

1.1- Les signaux mécaniques internes

Dans toute cellule végétale vivante, la pression de turgescence exerce une force multidirectionnelle et homogène sur la paroi cellulaire viscoélastique (Schopfer, 2006). Toutefois, les forces générées au sein de la paroi pecto-cellulosique vont dépendre de sa forme et de sa structure locale. Ainsi, si une cellule est entourée d'une paroi dont la structure est homogène, la cellule va tendre à croître sous la forme d'une sphère sous l'effet de la pression de turgescence. Les propriétés mécaniques de la paroi peuvent varier au sein d'une cellule et sont principalement déterminées par l'arrangement spatial des microfibrilles de cellulose qui lui confèrent une forte résistance à la déformation. Typiquement, dans les couches récemment déposées des parois primaires d'une cellule en élongation, les microfibrilles de cellulose sont orientées perpendiculairement à l'axe longitudinal de la cellule. Cette orientation particulière va déterminer le sens de la croissance cellulaire, dans ce cas, selon l'axe longitudinal. Les propriétés mécaniques internes de la paroi contribuent donc à l'orientation de la croissance cellulaire (Schopfer, 2006). Par ailleurs, au sein d'un tissu, les cellules sont affectées par les propriétés mécaniques des cellules avoisinantes. Ces contraintes entre cellules, au sein d'un tissu, liées à un différentiel de croissance sont appelées autocontraintes. En particulier, il a été démontré que, dans un organe constitué de tissus hétérogènes, les parois des cellules épidermiques sont sous forte tension, contrebalançant ainsi les pressions de turgescence exercées par les cellules internes (Kutschera *et al.*, 1987 ; Kutschera et Kohler, 1992).

De même, la maturation des cellules xylémiennes, près de l'assise cambiale, induit également la formation de contraintes mécaniques internes en raison de tendances au retrait des parois lors de cette phase (Fournier *et al.*, 1991a et b ; Telewski, 2006).

Au cours de leur vie, les plantes, et plus particulièrement les arbres en raison de leur taille pouvant atteindre plusieurs dizaines de mètres, sont soumis en permanence à la gravité terrestre. En effet, la variation de poids propre de la plante au cours de sa croissance engendre des contraintes au sein des tissus par l'effet de la gravité sur la masse des composants. Ces signaux mécaniques internes jouent un rôle important dans la mise en place de sa structure générale (Niklas, 1994 ; Telewski, 2006). Ainsi, la croissance des branches est modifiée par le poids des fruits (Almeras *et al.*, 2004).

Indépendamment de son poids propre, la plante est capable de percevoir une variation d'inclinaison de ses organes vis-à-vis de la gravité terrestre. Au cours de cette graviperception, la sédimentation des statolithes (ou tout autre organite) en direction du stimulus gravitropique va engendrer une déformation de la face interne de la membrane plasmique (Sack, 1991). D'autre part, la réorientation d'un organe en fonction du champ de gravité induit une croissance différentielle générant ainsi au sein du tissu des différences de pression interne dues à l'augmentation de la taille des cellules (Telewski, 2006). Chez les espèces ligneuses, la réponse gravitropique se caractérise par la mise en place d'un bois de réaction (bois de tension chez les angiospermes et bois de compression chez les gymnospermes). Ce bois particulier est caractérisé par une modification du nombre de vaisseaux mais aussi par une modification de la paroi secondaire des cellules faisant ainsi varier les propriétés mécaniques de la paroi (Telewski, 2006) ainsi que leur déformation de maturation.

Tous ces signaux sont qualifiés de « lents » vis à vis de la croissance, la cinétique de sollicitation pouvant agir avec la cinétique de croissance. Ces sollicitations mécaniques « internes » sont complexes à analyser puisqu'elles s'effectuent sur une structure en constante évolution.

1.2- Les signaux mécaniques externes

De nombreuses sollicitations mécaniques externes peuvent être perçues par les plantes. Les signaux mécaniques externes les plus fréquents induisent des flexions ou des torsions de certains organes des plantes, c'est le cas du vent dans l'atmosphère ou des courants dans l'eau. Une autre catégorie de sollicitations mécaniques externes regroupe tous les signaux induits par le « toucher », tels que certaines interventions humaines, l'impact de la pluie ou de la grêle.

Ces stimuli sont qualifiés de « rapides » par rapport à la croissance. Pendant leur durée d'application, la masse de la structure peut être considérée comme constante. L'effet de ce type de sollicitations mécaniques sur la croissance des plantes est appelé thigmomorphogenèse (Boyer, 1967 ; Jaffe, 1973).

Dans la littérature, les blessures (ou « wounding ») engendrées par des piqûres d'insectes ou par des herbivores sont souvent considérées comme des sollicitations mécaniques. Contrairement aux sollicitations mécaniques citées précédemment, la blessure implique la mort de certaines cellules. Dans la suite de ce travail, nous décrirons uniquement l'impact des sollicitations mécaniques non lésantes.

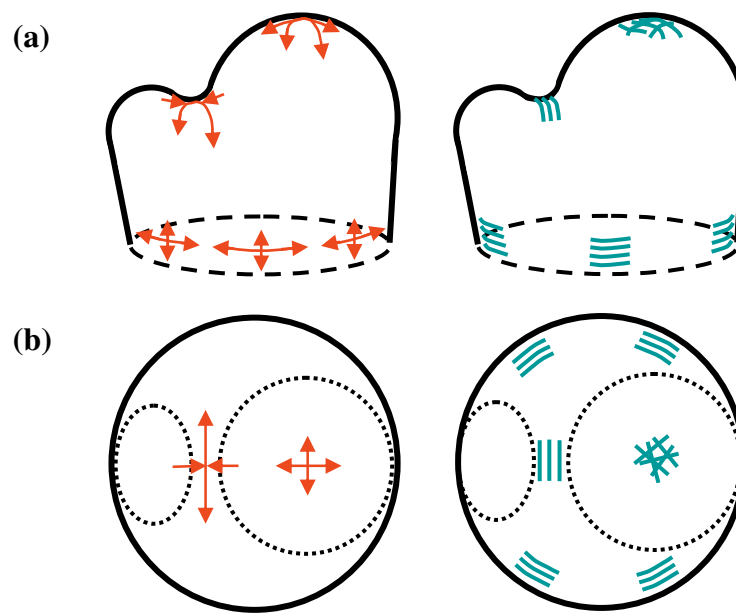


Figure 1 : Modélisation de l'orientation des signaux mécaniques et des microtubules sur un méristème apical d'*A. thaliana* (issu de Hamant *et al.*, 2008).

Les schémas représentent des méristèmes vus de profil (a) et vus de dessus (b). Les flèches rouges montrent l'orientation des principales sollicitations mécaniques auxquelles sont soumises les cellules méristématiques, les traits bleus correspondent aux microtubules.

II- Bilan sur les études des réponses physiologiques des végétaux aux signaux mécaniques

2.1- Importance des signaux mécaniques internes dans le développement et la croissance

Récemment, les études convergent pour souligner l'importance des signaux mécaniques internes au cours du développement, aussi bien chez les animaux (Ingber, 2005) que chez les végétaux (Hamant *et al.*, 2008).

En 2005, Nelson et ses collaborateurs ont cherché à comprendre comment l'architecture d'un tissu peut contrôler de manière rétroactive la croissance des cellules qui le composent. Ils ont ainsi mis en évidence, au sein d'une culture de cellules endothéliales d'artère pulmonaire bovine, l'existence de zones présentant une forte stimulation mécanique induite par la contraction des cellules en croissance. Il semblerait donc que les signaux mécaniques émis dans ces zones entraînent eux-mêmes une modification de l'architecture des tissus.

Chez les végétaux, le rôle des signaux mécaniques internes dans la morphogenèse a été étudié sur les méristèmes apicaux d'*A. thaliana* (Hamant *et al.*, 2008). Dans un premier temps, les auteurs ont démontré que la dépolymérisation des microtubules du cytosquelette ne modifiait pas la différenciation et l'identité des cellules dans le méristème mais altérait la géométrie de ces cellules et certains événements morphogénétiques au sein du méristème. Or, la modélisation de l'orientation des signaux mécaniques au sein des méristèmes montre que l'orientation des microtubules cellulaires est parallèle au profil d'action de ces signaux (figure 1). En modifiant expérimentalement les signaux mécaniques par ablation de certaines cellules internes du méristème, les auteurs observent une réorientation des microtubules dans leur direction. Ces résultats suggèrent que les signaux mécaniques internes régulent la morphogenèse en coordonnant l'orientation des microtubules du cytosquelette.

2.2- Les réponses physiologiques des plantes aux signaux mécaniques externes

Les études portant sur les effets des sollicitations mécaniques externes sur la croissance des plantes ont concerné un nombre important d'espèces végétales, monocotylédones (Crook et Ennos, 1996 ; Goodman et Ennos, 1996 ; Young *et al.*, 1997),



Figure 2 : Effet du vent sur la croissance longitudinale de *Medicago sativa* (Moulia et Combes, 2004).

Les pieds de luzerne sur lesquels l'effet du vent est atténué par un grillage (flèche rouge) sont significativement plus grands que les pieds non protégés (reste du champ).

dicotylédones herbacées (Heuchert et Mitchell, 1983 ; Biddington, 1986 ; Gartner, 1994 ; Tretnér *et al.*, 2008) et dicotylédones ligneuses (Telewski et Pruyn, 1998 ; Pruyn *et al.*, 2000 ; Coutand *et al.*, 2008).

Toutes ces études ont permis de mettre en évidence de nombreuses modifications morphogénétiques en réponse à ces sollicitations (Jaffe et Forbes, 1993). Nous nous proposons dans cette partie de présenter un état des lieux des connaissances actuelles concernant ces différentes réponses.

2.2.1- Modification de la croissance longitudinale

La plupart des études portant sur les effets des sollicitations mécaniques se sont intéressées à leur impact sur la croissance longitudinale de la partie aérienne des plantes.

2.2.1.1- En conditions naturelles, la croissance longitudinale est augmentée chez les plantes protégées du vent

De nombreux travaux ont été réalisés en conditions naturelles, et ont consisté à comparer la croissance d'un lot de plantes tuteurées, subissant donc moins les sollicitations mécaniques naturelles, à celle d'un autre lot de plantes laissées libres de tout mouvement. C'est le cas notamment des travaux de Larson (1965) sur *Larix laricina* qui ont montré que de jeunes arbres tuteurés pendant deux années présentaient une taille plus importante que les témoins laissés libres au vent. Ces résultats obtenus avec de jeunes plantes sont également retrouvés sur des arbres plus âgés. Ainsi, le tuteurage de pins, sur les 10 premiers mètres de tronc, pendant 6 ans a induit une augmentation de leur croissance longitudinale de 40% comparée à celle observée avant la mise en place des tuteurs. Pendant le même temps, la croissance des arbres témoins était de 20% inférieure aux années précédant le traitement (Meng *et al.*, 2006). Plus récemment, Coutand et ses collaborateurs (2008), ont mis en évidence que le tuteurage de jeunes plants de *Prunus avium* induisait également une augmentation de leur croissance longitudinale visible dès deux semaines. Des résultats similaires ont également été obtenus avec des plantes herbacées. Ainsi, lors de travaux en plein champs, Mouliat et Combes (2004) ont montré que des plants de luzerne (*Medicago sativa*) protégés par un grillage présentaient une croissance en longueur significativement plus importante que les plantes laissées libres de tout mouvement (figure 2). Tous ces travaux ont permis de montrer l'importance du vent en terme de signal mécanique sur la croissance longitudinale des plantes.

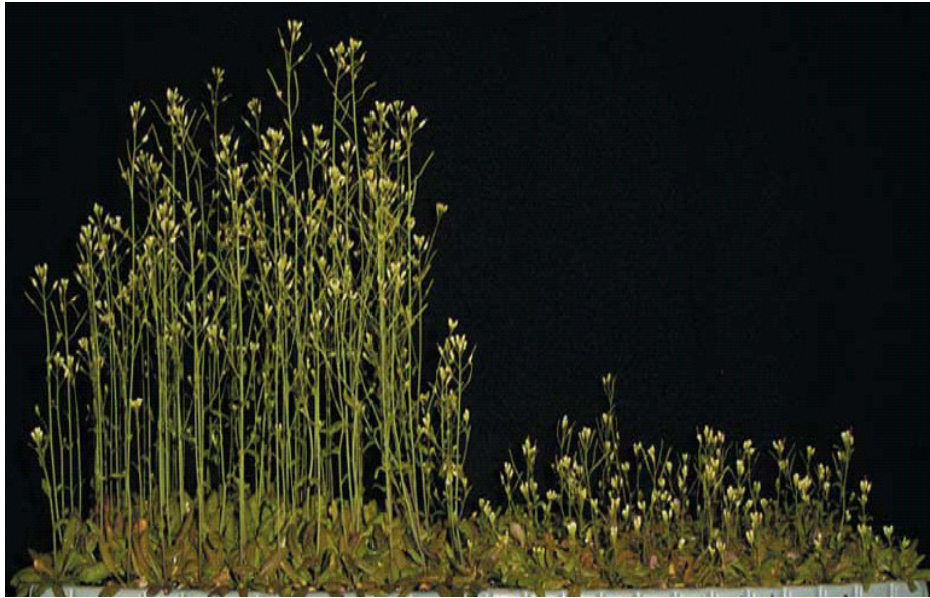


Figure 3 : Effet de touchers répétés sur la croissance longitudinale des hampes florales d'*A. thaliana* (Braam, 2005).

Les plantes touchées deux fois par jour pendant plusieurs jours (à droite) présentent des hampes florales dont la croissance longitudinale a été fortement diminuée par rapport aux plantes non sollicitées (à gauche).

2.2.1.2- L'application de sollicitations mécaniques artificielles entraîne une diminution de la croissance longitudinale

A côté de ces travaux en conditions naturelles qui visaient à étudier l'effet thigmomorphogénétique du vent en comparant des plantes laissées libres de tout mouvement et des plantes protégées du vent, les expériences présentées ci-dessous ont consisté à étudier l'effet de l'application de différentes sollicitations mécaniques sur la croissance des plantes. Ces travaux corroborent les résultats obtenus en conditions naturelles. Il a ainsi été montré que l'application de flexions répétées sur des plantules d'orme d'Amérique (*Ulmus americana*) entraîne une diminution de leur croissance longitudinale (Telewski et Pruyn, 1998). De même, la réalisation d'une flexion bidirectionnelle journalière de la tige de jeunes noyers (*Juglans regia*) pendant une semaine entraîne une diminution de leur croissance longitudinale (Leblanc-Fournier *et al.*, 2008). L'application d'autres types de sollicitations mécaniques telles que du broissage sur des sapins (*Abies fraseri*) conduit également à une diminution de leur croissance en longueur (Telewski et Jaffe, 1986b). Ces résultats obtenus sur des espèces ligneuses ont également été observés chez les monocotylédones (Goodman et Ennos, 1996) comme chez les dicotylédones herbacées telles que la tomate (*Lycopersicon esculentum*), suite au frottement d'un entre-nœud (Depège *et al.*, 1997) ou suite à une flexion (Coutand *et al.*, 2000). L'application, répétée trois fois par semaine pendant cinq semaines, de sollicitations mécaniques de type toucher sur des plants de *Medicago truncatula* entraîne une diminution de 25% de leur croissance en longueur par rapport aux plantes non sollicitées (Tretner *et al.*, 2008). L'effet des sollicitations mécaniques peut être très marqué chez certaines plantes telles qu'*A. thaliana*. En effet, des plants d'*A. thaliana* touchés deux ou trois fois par jour pendant plusieurs jours présentent des hampes florales beaucoup plus petites que des plants non traités (Braam, 2005 ; Chehab *et al.*, 2009 ; figure 3).

La variation de la croissance longitudinale suite à une sollicitation mécanique apparaît donc être une réponse commune de toutes les espèces testées quel que soit le type de sollicitation mécanique et se caractérise dans la majorité des cas par une diminution de la longueur des tiges.

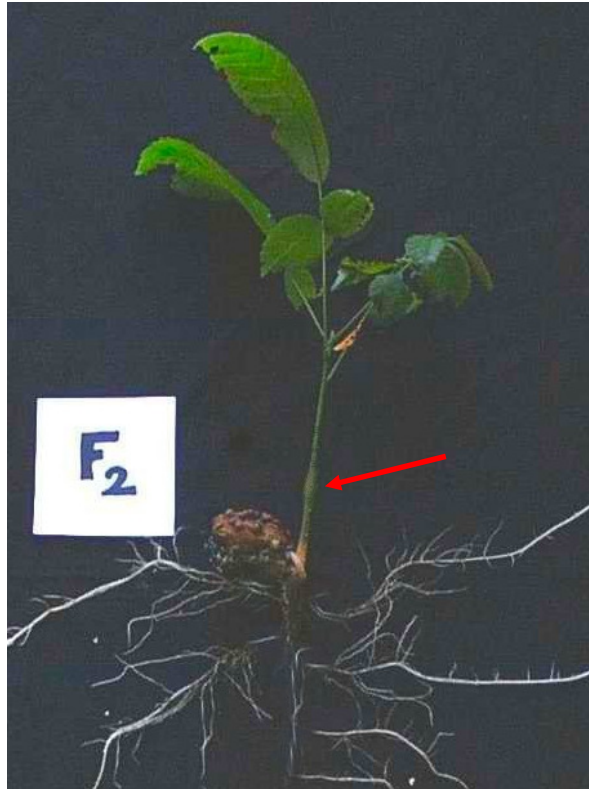


Figure 4 : Effet de flexions répétées sur la croissance radiale d'un jeune noyer (Crouzet, 2002).

Les noyers âgés de 3 semaines ont été soumis à une flexion bidirectionnelle par jour pendant une semaine. Une augmentation localisée du diamètre des plantes est visible à la base de la zone sollicitée (flèche rouge).

2.2.2- Modification de la croissance radiale et des caractéristiques mécaniques des tiges

2.2.2.1- Les sollicitations mécaniques entraînent des modifications de croissance radiale des tiges

Une autre conséquence des sollicitations mécaniques externes est une modification de la croissance radiale des tiges des plantes. Cependant, contrairement aux résultats obtenus au niveau des réponses de croissance longitudinale, les réponses de croissance radiale varient selon les expérimentations.

La plupart des études, portant sur des dicotylédones, ont montré une augmentation de la croissance radiale suite à une sollicitation mécanique. Ainsi, l'application de touchers répétés sur de jeunes plants de haricot (*Phaseolus vulgaris*) entraîne une augmentation de leur croissance radiale au niveau de la zone sollicitée (Jaffe, 1976). Chez les espèces ligneuses, la plupart des travaux montre également une augmentation de la croissance radiale des tiges (Telewski et Pruyn, 1998 ; Pruyn *et al.*, 2000 ; Coutand *et al.*, 2008 ; Leblanc-Fournier *et al.*, 2008 ; Porter *et al.*, 2009). L'application d'un traitement journalier de 20 flexions pendant deux mois sur deux hybrides de peupliers se traduit par une augmentation significative, de 130 à 140% suivant l'hybride, de leur diamètre par rapport aux témoins non sollicités (Pruyn *et al.*, 2000). De jeunes noyers fléchis une fois par jour pendant une semaine, présentent un diamètre trois fois plus grand, au niveau de la zone sollicitée, que celui des individus non traités (Leblanc-Fournier *et al.*, 2008 ; figure 4).

Cette réponse de croissance n'apparaît cependant pas être universelle. En 1985, les travaux de Biddington et Dearman sur le chou-fleur (*Brassica oleracea*) ont abouti à des résultats totalement opposés. En effet, leur étude a montré que le brossage de jeunes plantules une minute et demie par jour pendant 11 à 13 jours entraîne une diminution du diamètre de l'hypocotyle. Enfin, chez d'autres plantes, aucune modification de la croissance radiale n'est observée. Ainsi, des pieds de maïs (*Zea mays*) et de tournesol (*Helianthus annuus*) fléchis une fois par jour pendant plusieurs semaines ne présentent pas de différence de diamètre par rapport à des plantes non sollicitées alors que la réduction de leur hauteur est significative (Goodman et Ennos, 1996).

2.2.2.2- Modification des caractéristiques mécaniques des tissus

Dans la plupart des cas, la modification de la croissance radiale des tiges peut également s'accompagner d'une modification des caractéristiques mécaniques des tissus. Celle-ci varie entre les espèces, voire au sein d'une même espèce (Pruyn *et al.*, 2000). Chez les monocotylédones comme le blé (*Triticum aestivum*), la réponse au vent se caractérise par des tiges plus résistantes et moins flexibles (Crook et Ennos, 1996). Les travaux de Patterson en 1992 ont mis en évidence une augmentation de la rigidité en flexion de tiges de tournesol qui ont subi un traitement journalier d'une minute composé de plusieurs flexions à une fréquence de 2 Hz pendant six semaines. Une augmentation de la rigidité de la tige a également été observée chez des gymnospermes tels que *Pinus taeda* et *Abies fraseri* (Telewski et Jaffe 1986a, 1986b).

Un paramètre mécanique souvent mesuré est le module de Young qui caractérise la rigidité d'un matériau. A contrainte égale, un matériau ayant un module d'élasticité élevé subira une déformation plus faible qu'un matériau ayant un module d'élasticité petit. Là encore, les réponses sont différentes en fonction des espèces. Ainsi, l'application d'une sollicitation mécanique de type secouage, sur des tomates, entraîne une augmentation du module de Young des tiges (Heuchert et Mitchell, 1983). Des différences de réponse peuvent être observées entre des individus très proches. Ainsi, les travaux de Pruyne et ses collaborateurs (2000), sur deux hybrides de peuplier ont montré une diminution du module de Young chez l'un des hybrides et pas chez l'autre, ce module correspondant à 80% de celui observé chez les témoins non sollicités.

Ces variations des propriétés mécaniques des tiges peuvent s'expliquer par des modifications de l'anatomie des tiges dans le nouveau bois mis en place au cours de l'augmentation de la croissance radiale. Ainsi, chez le haricot, une augmentation de la production de tissus de soutien a été mise en évidence (Jaffe *et al.*, 1984). Chez le *Liquidambar styraciflua*, ce sont des diminutions de la longueur et du diamètre des vaisseaux qui ont été remarquées (Neel et Harris, 1971). Chez le peuplier, le diamètre des vaisseaux ainsi que leur nombre diminuent dans le bois formé après flexion (Kern *et al.*, 2005). Ce bois particulier formé suite à des flexions répétées a été nommé « flexure wood » par les auteurs.

2.2.3- Autres modifications physiologiques observées

2.2.3.1- Modification de la croissance du système racinaire

Même si la plupart des études ont porté sur l'effet des sollicitations mécaniques sur la croissance aérienne, certains travaux ont caractérisé les modifications de croissance induites au niveau du système racinaire. En 1996, les travaux de Goodman et Ennos ont ainsi montré que des plants de maïs et de tournesol fléchis présentaient des racines plus rigides et plus grosses, leur conférant ainsi un meilleur ancrage. Cependant, des différences dans la réponse ont pu être mises en évidence entre les deux espèces : le diamètre basal des racines de maïs présentait une augmentation de 8% contre 16% pour le tournesol. Cette différence est liée à l'absence de croissance secondaire chez les monocotylédones (Goodman et Ennos, 1996). Concernant la croissance en longueur des racines, l'application de flexions sur des plants de tomate n'entraîne pas de modification significative de leur allongement (Gartner, 1994).

Des travaux menés sur des gymnospermes *Larix decidua* et *Picea sitchensis* ont montré que le vent stimule la croissance en diamètre des racines et modifie globalement leur morphogénèse. Les racines placées du côté du vent sont les plus affectées car elles permettent de contrer ses effets sur les arbres (Stokes *et al.*, 1995).

2.2.3.2- Modification de l'allocation de la biomasse

Un autre paramètre pouvant être affecté par l'application de sollicitations mécaniques est l'allocation de la biomasse entre les différentes parties de la plante. Dans la plupart des cas, le stimulus mécanique n'entraîne pas de modification de la biomasse totale mais entraîne une modification de la répartition de celle-ci dans la plante au profit du système racinaire (Coutand *et al.*, 2008). Ainsi, l'application de sollicitations mécaniques de type flexion sur des plants de tomate (Gartner, 1994) ou des jeunes plants de merisiers (Coutand *et al.*, 2008) entraîne une augmentation du rapport entre le poids sec des racines et celui de la partie aérienne. Si des différences de répartition de la biomasse ont souvent été observées, celles-ci n'impliquent pas forcément une diminution de la biomasse aérienne en même temps qu'une augmentation de la biomasse racinaire. En effet, il a été montré que la flexion de plants de tournesol n'entraîne pas de variation significative de la biomasse aérienne (Patterson, 1992). Des travaux portant sur des plants de *Medicago truncatula*, touchés trois fois par semaine pendant cinq semaines, ont montré, au contraire, une forte augmentation de la biomasse aérienne des individus malgré une forte diminution de leur élongation. Dans d'autres cas, la

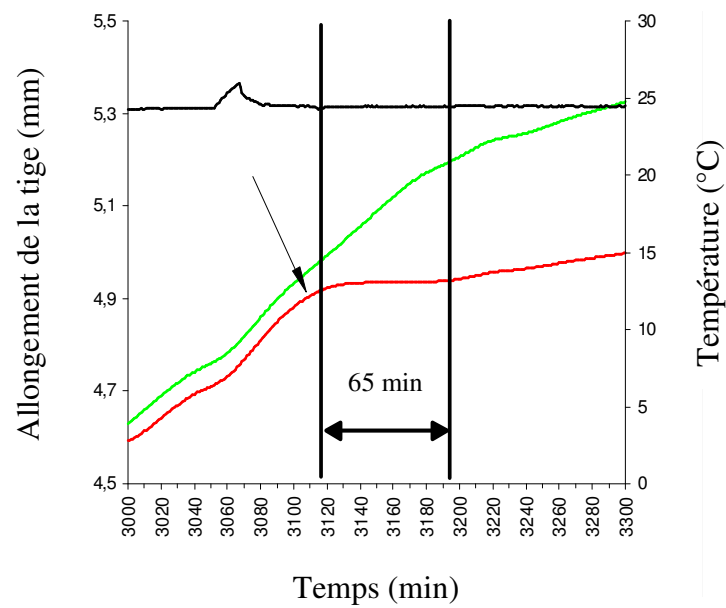


Figure 5 : Effet d'une flexion transitoire sur l'allongement d'une tige de tomate (Coutand *et al.*, 2000).

Les enregistrements ont été effectués à l'aide de capteurs LVDT (Linear Voltage Differential Transducer) sur une plante témoin (courbe verte) et une plante fléchie (courbe rouge). L'application d'une flexion (flèche noire) induit très rapidement un arrêt de la croissance longitudinale pendant 65 minutes. La croissance reprend ensuite progressivement mais à une vitesse inférieure à celle du témoin.

biomasse racinaire peut ne pas être affectée par les sollicitations mécaniques. Ainsi, l'application de sollicitations de type toucher sur des pieds de luzerne n'entraîne aucune variation de la biomasse racinaire (Tretner *et al.*, 2008).

2.2.3.3- Modification d'autres processus

Les sollicitations mécaniques peuvent également modifier d'autres processus importants pour les plantes. Ainsi, une altération du contenu en chlorophylle, une variation du niveau d'hormones, mais également une modification de l'ouverture des stomates et des retards de floraison peuvent être observés (Biddington, 1986).

Une inhibition de la croissance des inflorescences couplée à des retards de floraison ont pu être observés sur des plantules d'*A. thaliana* touchées trois fois par jour pendant plusieurs jours (Chehab *et al.*, 2009). L'application de sollicitations de type toucher entraîne une augmentation du contenu en chlorophylle de pieds de luzerne (Tretner *et al.*, 2008). Au contraire, chez le ligneux tropical *Carica papaya*, l'application de sollicitations mécaniques de type toucher conduit à une diminution du contenu en chlorophylle (Porter *et al.*, 2009).

2.2.4- *Mise en évidence d'un transfert d'informations dans les zones en croissance suite à une sollicitation mécanique*

L'ensemble des études présentées jusqu'ici montrent que les réponses physiologiques ne sont pas cantonnées aux zones stimulées mais sont également visibles dans des zones non stimulées (Erner *et al.*, 1980 ; Biddington, 1986). Par exemple, le frottement du quatrième entre-nœud de jeunes plants de tomate présentant six entre-nœuds développés entraîne une diminution de l'allongement de l'entre-nœud stimulé mais aussi des deux entre-nœuds situés au-dessus (Depège *et al.*, 1997). De manière intéressante, une flexion contrôlée, appliquée sur un entre-nœud dont la croissance longitudinale est terminée, entraîne un arrêt de la croissance en longueur de tiges de tomate dès 5 minutes après la flexion (Coutand *et al.*, 2000). La croissance des jeunes entre-nœuds reprend 65 minutes après la sollicitation à une vitesse inférieure à celle du témoin. La tige fléchie ne retrouve une vitesse d'allongement similaire à celle du témoin qu'au bout de 2 à 16 heures (figure 5). Le transfert d'information entre la zone basale fléchie et la zone apicale en croissance est donc rapide (Coutand *et al.*, 2000). La nature des informations circulant dans la tige au cours de ce transfert n'est pas encore définie.

2.2.5- L'acclimatation des plantes aux sollicitations mécaniques

En conditions naturelles, les plantes sont soumises continuellement au vent. L'action du vent se traduit majoritairement par des flexions et des vibrations au niveau des plantes. Comme nous l'avons décrit précédemment, des flexions répétées sur des tiges en croissance entraînent généralement une diminution de leur croissance longitudinale. Les espèces ligneuses peuvent malgré tout atteindre plusieurs dizaines de mètres de hauteur, ce qui implique sûrement une acclimatation des plantes à des sollicitations mécaniques multiples. Les réponses physiologiques mises en place suite à des sollicitations mécaniques conduisent probablement à une meilleure résistance des plantes à de nouvelles sollicitations (Jaffe *et al.*, 1984 ; Biddington, 1986). Ainsi, la réduction de la croissance des tiges diminuerait la prise au vent des plantes et l'augmentation de la rigidité de la tige augmenterait sa résistance à la flexion. D'autre part, l'augmentation de la biomasse racinaire assurerait un meilleur ancrage des plantes face au vent. Cependant, la valeur adaptative des réponses thigmomorphogénétiques suite à des sollicitations mécaniques n'a pas encore été réellement démontrée.

Si plusieurs travaux ont été menés sur l'acclimatation des plantes à d'autres stress abiotiques comme le froid (voir Bruce *et al.*, 2007 pour une revue), peu d'informations sont disponibles concernant l'acclimatation des plantes à des sollicitations mécaniques multiples. L'effet de l'application d'un nombre variable de flexions journalières sur de jeunes *Ulmus americana* a été étudié par Telewski et Pruyn en 1998. Leurs résultats ont permis de montrer que les arbres étaient plus sensibles à un faible nombre de flexions (5 par jour) plutôt qu'à un nombre élevé de flexions (80 par jour). Au cours d'une étude impliquant des flexions contrôlées (8 flexions par jour avec un déplacement constant de la tige), Coutand et ses collaborateurs (2008) ont montré que la réponse de croissance de jeunes *Prunus avium* présentait une tendance globale à diminuer avec la répétition des sollicitations. Ces deux études suggèrent une acclimatation des plantes aux sollicitations mécaniques, c'est-à-dire que la réponse de la plante à un moment donné semble dépendre de l'histoire mécanique qu'elle a subie.

Cependant, jusqu'à présent, les effets de sollicitations mécaniques multiples ont été étudiés en mesurant leur impact final sur la croissance des plantes, aucune étude n'a porté sur leurs effets à court terme. La caractérisation précise d'un processus d'acclimatation n'a pas, à notre connaissance, été effectuée.

L'ensemble de ces données bibliographiques met en évidence une grande variabilité des réponses physiologiques suite aux sollicitations mécaniques externes. Cependant, ces signaux mécaniques ont été simulés en laboratoire par différents types de sollicitations tels que des brossages (Biddington et Dearman, 1985 ; Telewski et Jaffe, 1986a), des frottements (Depège *et al.*, 1997), des vibrations (Neel et Harris, 1971 ; Heuchert et Mitchell, 1983 ; Mitchell, 1996), des flexions (Patterson, 1992 ; Gartner, 1994 ; Osler *et al.*, 1996 ; Pruyn *et al.*, 2000) ou de simples touchers (Chehab *et al.*, 2009 ; Tretner *et al.*, 2008). Ces différents types de sollicitations sont largement dépendants de l'expérimentateur, difficilement reproductibles et pour certains difficilement quantifiables.

En plus des différences importantes au niveau du type de sollicitation appliquée, on peut également noter une grande variabilité quant à la durée et au nombre des traitements réalisés. Si dans certaines études, les plantes ont subi une sollicitation unique (Depège *et al.*, 1997 ; Coutand *et al.*, 2000), dans d'autres, des stress répétés ont été appliqués une ou plusieurs fois par jour pendant plusieurs jours (Leblanc-Fournier *et al.*, 2008), voire plusieurs semaines (Coutand *et al.*, 2008) ou plusieurs mois (Telewski et Jaffe, 1986a ; Telewski et Pruyn 1998 ; Pruyn *et al.*, 2000 ; Tretner *et al.*, 2008).

Les travaux basés sur une quantification du stimulus mécanique restent rares (Coutand *et al.*, 2000). Pour pouvoir analyser le stimulus mécanique tout en restant dans des types de sollicitations les plus fréquemment subies par les plantes en conditions naturelles, la flexion apparaît être un choix pertinent (Coutand et Moulia, 2000). Bien qu'elles restent encore rares, les études quantitatives de la thigmomorphogenèse permettent *a priori* des avancées importantes dans l'analyse du processus thigmomorphogénétique telles que la recherche de lois d'action entre le stimulus et les réponses des plantes (Coutand and Moulia, 2000), mais aussi la comparaison des expériences entre elles.

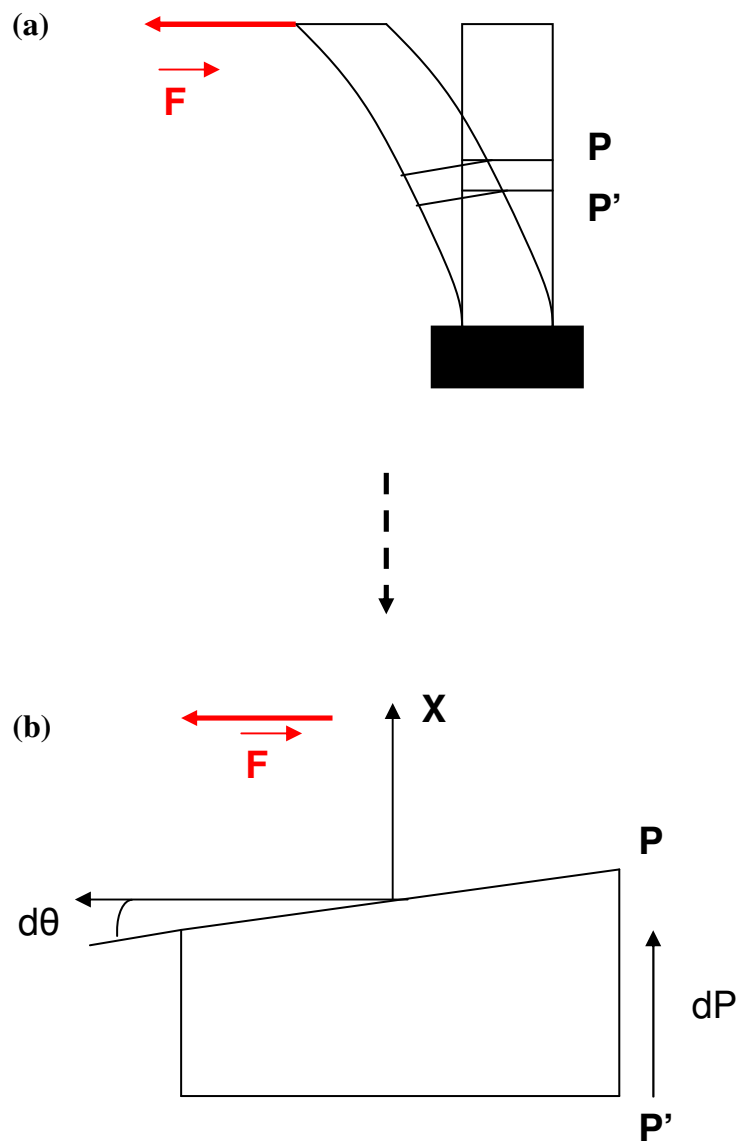


Figure 6 : Analyse mécanique d'une poutre en flexion.

L'effet de l'application de sollicitation de force F est présentée au niveau global (a) puis au niveau d'une tranche infinitésimale d'épaisseur $P'P$ (b).

III- La mécanoperception

Ce chapitre présente les connaissances disponibles en ce qui concerne la variable mécanique perçue puis fait un état des lieux des connaissances sur les structures cellulaires impliquées dans la mécanoperception.

3.1- La variable mécanique perçue

Pour pouvoir aller plus loin qu'une simple observation des changements phénotypiques, il a fallu déterminer la variable physique perçue lors d'une sollicitation mécanique.

Avant de présenter les travaux ayant conduit à la proposition d'un modèle intégratif de la mécanoperception, nous commencerons par rappeler quelques notions de mécanique des structures et en particulier de théorie des poutres, en nous limitant au type de sollicitation utilisée dans ce travail, la flexion.

3.1.1- Notions de théorie des poutres

Lors d'une sollicitation mécanique dite « rapide » telle qu'une flexion transitoire, la tige peut être considérée comme une poutre sans croissance. Si cette poutre est encastree à un bout et soumise à un chargement transverse (figure 6a), elle va subir une flexion.

A l'échelle globale, la poutre est soumise à une force F qui induit un déplacement des différentes parties de celle-ci. Si on considère maintenant que la poutre est constituée d'un empilement longitudinal de tranches infinitésimales, la flexion entraîne la rotation des différentes sections de ces tranches les unes par rapport aux autres (figure 6b). Sous l'hypothèse que lors des rotations, les sections droites restent planes, une tranche d'épaisseur infinitésimale dP (dP = distance entre P et P') au sein de cette poutre, va subir une rotation de la section droite P par rapport à la section P' d'un petit angle $d\theta$. L'axe de cette rotation est appelé axe neutre x . La courbure au niveau de cette tranche ($C_{(P)}$) est définie comme la variation linéique d'angle :

$$C_{(P)} = d\theta_{(P)} / dP$$

En terme d'effort interne, la force F agit sur la surface P avec un certain bras de levier, créant ainsi un moment fléchissant $M_{(P)}$.

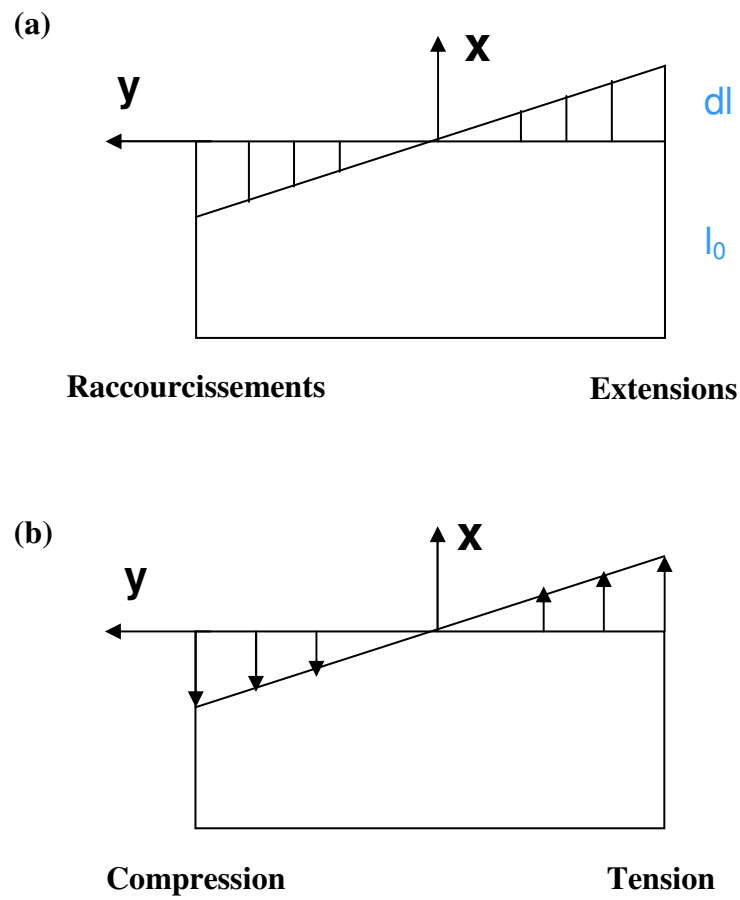


Figure 7 : Distribution des déformations longitudinales (a) et des contraintes normales (b) sur un petit élément de poutre au cours d'une flexion pure.

A une échelle plus locale au sein de cette tranche, l'état mécanique d'un petit élément situé à une distance y de l'axe neutre x , est caractérisé par deux variables : des déformations et des contraintes. Ainsi, les rotations des différentes sections de la tranche se traduisent par des déformations linéaires ε , dans le sens longitudinal, qui correspondent à des extensions du côté convexe, et à des raccourcissements du côté concave (figure 7a). Toujours sous l'hypothèse que la section droite reste plane au cours de la flexion et sous l'hypothèse des petites déformations, la déformation longitudinale est donnée par le produit de la courbure $C_{(P)}$ de la ligne neutre x par la distance y de l'élément considéré par rapport à cette ligne neutre :

$$\varepsilon_{LL(P)} = dl/l_0 \cdot y * C_{(P)}$$

On peut voir que la flexion provoque une hétérogénéité transversale des champs de déformation au sein de chaque section : plus on s'éloigne de la ligne neutre, plus la déformation est importante. Elle est maximale à la périphérie de la poutre.

Dans une poutre constituée d'un matériau homogène ou dans une poutre constituée de plusieurs matériaux mais présentant un axe de symétrie central (cas d'une tige formée de différents matériaux concentriques), l'axe neutre est confondu avec la ligne moyenne géométrique.

Le moment fléchissant créé par F présente un gradient longitudinal (le long de la poutre) ; au niveau de chaque tranche infinitésimale, le moment se distribue en des contraintes longitudinales σ sur la section P qui sont des contraintes de tension du côté convexe et des contraintes de compression du côté concave (figure 7b). La contrainte longitudinale au niveau d'un petit élément de poutre constitué d'un matériau élastique linéaire est donnée par le produit de la déformation par le module d'élasticité ou module de Young E_{LL} de l'élément considéré :

$$\sigma_{(y,P)} = \varepsilon_{LL(P)} * E_{LL}$$

L'état mécanique global d'une tige en flexion est donc défini par deux types de variables : une variable statique (la force appliquée) et une variable cinématique (le déplacement). A l'échelle de la section droite, l'état mécanique d'une section est défini par le moment fléchissant (variable statique) et par la courbure (variable cinématique). A une échelle encore plus locale, c'est-à-dire à l'échelle d'un petit morceau de tige, l'état mécanique est défini par la contrainte (variable statique) et la déformation (variable cinématique). Toutes

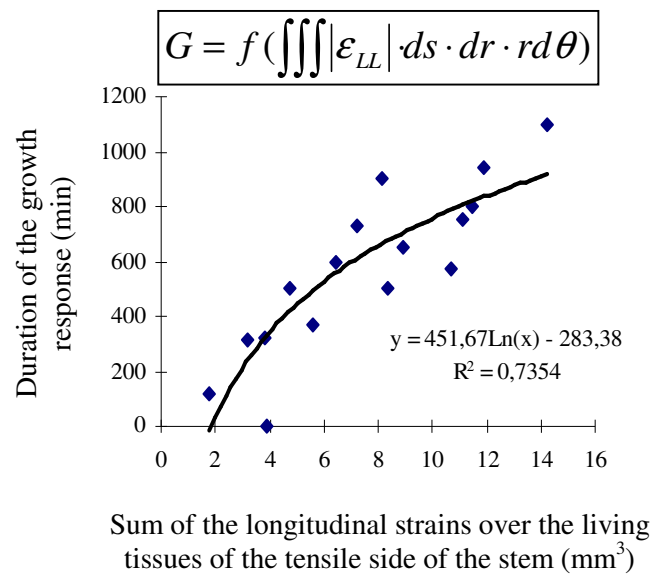


Figure 8 : Effet de la somme des déformations sur la durée de la réponse de croissance longitudinale de tomates (Coutand et Moulia, 2000).

Les résultats ont fait apparaître une relation logarithmique entre la durée de la réponse de croissance et la somme des déformations appliquées.

ces variables caractérisent l'état mécanique de la tige et sont donc potentiellement perçues par la plante.

3.1.2- Modèle intégratif de la mécanoperception

Afin de déterminer quelle est la variable mécanique perçue, une étude biomécanique quantitative de l'effet d'une flexion contrôlée sur la croissance longitudinale de la tige de tomate a été réalisée par Coutand et ses collaborateurs (2000). Ces travaux ont recherché s'il existait une relation quantitative entre le stimulus mécanique appliqué et la réponse de croissance de la plante. Les réponses de croissance ont été analysées en faisant varier l'état mécanique des tiges fléchies. L'état mécanique de chaque tige fléchie a été quantifié. En testant différents scénarii (perception de la force appliquée, perception de la déformation maximale, perception de la contrainte maximale, perception de la somme des déformations sur la périphérie de la tige, sur la totalité de la surface de la tige), Coutand et Moulia (2000) ont mis en évidence la corrélation la plus forte entre la durée de la réponse de croissance et la somme des déformations longitudinales subies par la tige (figure 8). Ils n'ont mis en évidence aucune relation entre la force ou les contraintes et la réponse de croissance. Il apparaît donc que la variable perçue par la cellule au cours d'une flexion est la déformation des tissus (ϵ) et non pas la contrainte (σ).

Partant de ces observations, Coutand et Moulia (2000) ont proposé un modèle intégratif de la mécanoperception. Ce modèle est basé sur deux hypothèses :

- (i) Chaque volume infinitésimal dV de tissu produit un signal systémique secondaire pratiquement proportionnel à la déformation qu'il a subi ($dS = k \cdot \epsilon \cdot dV$), ce qui signifie que les réponses cellulaires primaires locales doivent, dans cette hypothèse, être proportionnelles à $\epsilon \cdot dV$,
- (ii) Les signaux systémiques secondaires dS s'additionnent pour générer un signal systémique cumulé S qui va aller agir sur la zone en croissance et entraîner une réponse de croissance de la tige.

Tout ceci permettant d'aboutir à l'équation (1) décrivant le signal systémique cumulé :

$$S = k \iiint_{\text{tissus sollicités}} \epsilon_{(x,y,z)} \cdot dx \cdot dy \cdot dz \quad (1)$$

Au cours de leur étude, Coutand et Moulia (2000) ont mis en évidence une relation logarithmique entre la durée de la réponse de croissance des plantes D et le signal S :

$$D = a \cdot \ln(S/S_0) \quad \text{pour } S \geq S_0 \quad (2)$$

L'équation (2) indique qu'au-dessus d'un seuil S_0 , l'effet du signal intégré S est logarithmique avec une sensibilité égale à a . Etant donné que le signal intégré S est proportionnel à la somme des déformations longitudinales subies, le modèle de mécanoperception proposé pourrait permettre de quantifier le signal mécanique local perçu par les cellules afin de l'intégrer dans une réponse à l'échelle de la plante entière (Braam, 2005 ; Telewski, 2006). Cependant, ce modèle a été obtenu en mesurant une réponse de croissance située à distance de la zone sollicitée, ce qui implique l'intégration de différents mécanismes tel que par exemple un transfert d'informations. Il semble donc intéressant de le valider dans le cadre d'une réponse locale au sein du tissu sollicité afin de pouvoir tester directement les hypothèses (i) et (ii).

L'identification de la variable mécanoperçue par les plantes revêt un intérêt important dans la compréhension de la réponse des plantes aux sollicitations mécaniques. En effet, ceci permet, à travers le contrôle de cette variable par l'expérimentateur, une étude quantitative du phénomène de régulation de la perception du signal mécanique.

3.2- Comment la cellule perçoit-elle la variable mécanique ?

Les structures cellulaires qui sont capables de percevoir les déformations et qui vont conduire aux réponses moléculaires et physiologiques sont encore sujettes à débat. Dans les paragraphes suivants, nous donnerons l'état actuel des connaissances à ce sujet.

3.2.1- Les canaux mécanosensibles

La perception d'un stimulus mécanique par des cellules a été montrée en 1984 par Guharay et Sachs qui ont révélé l'existence de canaux mécanosensibles dans des cellules animales. Chez les espèces bactériennes et animales, ces canaux joueraient un rôle

d'intermédiaire dans la perception de la pression, des contacts et des sons (Hamill et Martinac, 2001 ; Kung, 2005).

Chez les plantes, l'activité de canaux ioniques mécanosensibles transporteurs d'ions Cl^- , K^+ et Ca^{2+} a été mise en évidence, par patch-clamp, au niveau du plasmalemm de protoplastes de cellules de garde de vesce (*Vicia faba*) (Cosgrove et Hedrich, 1991). Une étude du même type a montré l'implication de canaux calciques dans l'entrée du Ca^{2+} dans la cellule en réponse à une déformation de la membrane (Ding et Pikard, 1993). Jusqu'à présent les nombreux travaux réalisés avaient seulement réussi à montrer l'activité des canaux mécanosensibles chez les plantes. Il a fallu attendre les travaux de Haswell et Meyerowitz en 2006 pour que les premiers canaux mécanosensibles, appelés MscS-Like ou MSL, soient identifiés chez *A. thaliana*. Ces canaux sont des homologues des canaux MscS découverts chez *Escherichia coli*. Chez les bactéries, ces MscS sont activés suite à des tensions exercées sur la bicouche lipidique de la membrane plasmique (Hamill, 2006). Des études cinétiques réalisées chez la levure, les bactéries ou en liposomes artificiels ont révélé que ces canaux présentent des dynamiques d'ouverture avec des temps de relaxation compris entre 1 et 3 secondes. Chez *A. thaliana*, des protéines MSL2 et MSL3 ont été retrouvées sur la membrane des chloroplastes (Haswell et Meyerowitz, 2006). Des plantes mutées pour ces deux protéines présentent des malformations dans la taille et la forme des plastes. Plus récemment, toujours chez *A. thaliana*, deux autres protéines MSL (MSL9 et MSL10) ont été mises en évidence sur la membrane plasmique de cellules racinaires (Haswell *et al.*, 2008).

3.2.2- Le continuum CPMCW (Cytoskeleton – Plasma Membrane – Cell Wall)

Actuellement, les études concernant la perception des signaux mécaniques par les cellules végétales suggèrent que les canaux mécanosensibles ne sont pas les seuls acteurs de la perception des signaux mécaniques.

La perception d'un signal mécanique par les cellules est un processus rapide impliquant une transformation rapide du message mécanique en un message chimique ou électrique (Baluska *et al.*, 2003 ; Ingber, 2003a et b). Chez les animaux, les travaux récents indiquent que la perception et la transduction des signaux mécaniques impliquent le couplage physique entre le cytosquelette et la membrane plasmique *via* des intégrines (Janmey, 1998 ; Baluska *et al.*, 2003 ; Ingber, 2003a et b).

Jaffe et ses collaborateurs (2002) ont proposé l'existence d'un réseau similaire chez les plantes qui relierait le cytosquelette, la membrane plasmique et la paroi cellulaire. Ils

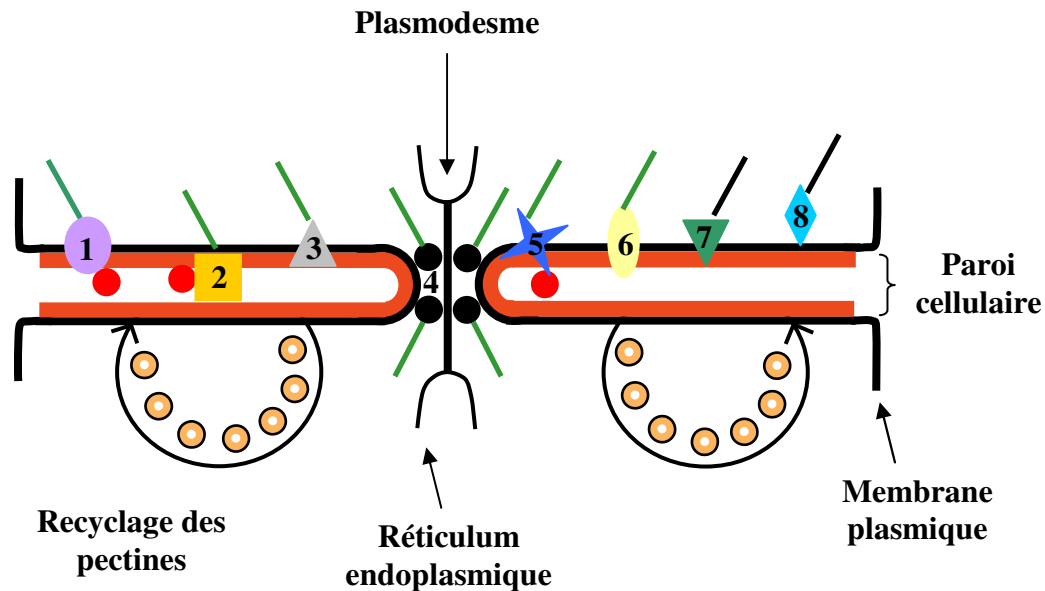


Figure 9 : Représentation schématique des différents protéines de liaison potentielles entre le cytosquelette, la membrane plasmique et la paroi des cellules végétales (Baluska *et al.*, 2003).

Ce schéma représente la jonction entre deux cellules de racine avec un plasmodesme traversé par un élément de réticulum endoplasmique. Les pectines (ronds rouges) situées dans la paroi peuvent interagir directement avec des WAKs (Wall Associated Kinases), d'autres kinases récepteurs-like et des protéines d'arabinogalactane ou AGPs (ArabinoGalactan Proteins). Les éléments de liaison potentiels, numérotés de 1 à 8 sont supposés interagir directement, ou *via* d'autres molécules, soit avec des filaments d'actine (traits verts), soit avec des microtubules (traits noirs). Des myosines de classe VIII (ronds noirs) s'accumulent dans les plasmodesmes et serviraient d'adaptateurs entre les filaments d'actine et les callose-synthases. Les protéines de liaison putatives entre le cytosquelette et la paroi comprennent : des WAKs (1), des AGPs (2), des callose-synthases (3), des myosines de classe VIII spécifiques des plantes (4), des kinases récepteurs-like (5), des formines (6), des cellulose-synthases (7) et des phospholipases D (8).

suggèrent que l'application d'une pression sur la membrane plasmique entraîne des modifications induisant l'ouverture de canaux mécanosensibles d'une part, et une perturbation des liaisons entre la paroi, la membrane plasmique et le cytosquelette d'autre part. Ces perturbations permettraient la transformation des stimuli externes en signaux internes. Leur modèle suggère que ces interactions physiques auraient lieu dans des régions particulières de la membrane plasmique appelées filaments de Hecht. Ces régions particulières, constituées de microfilaments d'actine, de microtubules et de réticulum endoplasmique, forment un lien entre la membrane plasmique et la paroi visible lors de la plasmolyse (Lang *et al.*, 2004). Chez les animaux, les intégrines se fixent sur des motifs de type RGD (Arg-Gly-Asp). Or, l'exposition des parois à des peptides synthétiques de type RGD déclenche la perte des filaments de Hecht. Il existerait donc, chez les plantes, des protéines integrine-like reconnaissant également des motifs RGD et impliquées dans ce couplage physique. Ces protéines, similaires aux intégrines, permettraient de relier les microtubules à la membrane plasmique contenant des canaux calciques. Le faisceau hechtien relierait alors la membrane plasmique à la paroi cellulaire *via* la liaison aux filaments d'actine, facilitant ainsi l'ouverture et la fermeture des canaux mécanosensibles (Jaffe *et al.*, 2002 ; Telewski, 2006 ; Chehab *et al.*, 2009).

Les travaux de Baluska et ses collaborateurs (2003) ont cependant émis un doute quant au rôle des protéines de type integrine-like dans le modèle CPMCW. Ils proposent l'implication d'autres protéines de liaison pouvant jouer le rôle des intégrines. Au cours des années qui ont suivi, d'autres études ont mis en avant les myosines de classe VIII ainsi que les formines comme étant les molécules de liaison les plus vraisemblables dans le réseau (Baluska et Hlavacka, 2005). Le rôle des formines dans la formation des filaments d'actine a été montré (Michelot *et al.*, 2005 ; Yi *et al.*, 2005). De plus, certaines formines contiennent un domaine extensine-like qui s'insère dans la paroi, renforçant ainsi la possibilité qu'elles jouent un rôle dans la liaison du cytosquelette à la paroi (Cvrckova *et al.*, 2004). Pour ce qui est des myosines de type VIII, leur intervention dans la synthèse de callose a été proposée (Baluska *et al.*, 2003). Or, plusieurs études montrent la synthèse de callose au cours de la mécanoperception (Jaffe et Leopold, 1984 ; Sivaguru *et al.*, 2000), ce qui confirmerait une intervention des myosines de type VIII dans la liaison des différentes parties du réseau CPMCW. Les protéines pouvant intervenir dans la liaison du cytosquelette avec la paroi cellulaire ont été proposées par Baluska et ses collaborateurs en 2003 (figure 9). L'adhésion de la membrane plasmique à la paroi des cellules pourrait impliquer des protéines AGP

(ArabinoGalactan Protein) et des kinases associées à la paroi ou WAKs (Wall Associated Kinases). Chez les cellules BY-2 de tabac, des canaux mécanosensibles spécifiques du calcium semblent groupés sur la membrane plasmique et associés avec des AGPs et des WAKs (Gens *et al.*, 2000).

Temps après l'application de la sollicitation	Réponses cellulaires	Réponses de croissance
1 à 10 s	Formation d'un potentiel d'action Ouverture des canaux mécano- sensibles	
1 à 2 min	Entrée de Ca^{2+} dans le cytosol Production d'espèces activées de l'oxygène Blocage du transport phloémien	
2 à 8 min		Arrêt de la croissance longitudinale
10 à 30 min	Expression de gènes codant des calmodulines (gènes <i>TOUCH</i>) Expression de gènes de la biosynthèse de l'éthylène (<i>ACC synthase</i>) Expression d'un gène codant une protéine à doigts de zinc (<i>JrZFP2</i>)	
30 min	Modification de l'expression de gènes codant des protéines du métabolisme	
30 à 60 min		Reprise progressive de la croissance longitudinale
1 à 2 h	Retour à l'expression de base des gènes <i>TOUCH</i> , <i>ACS6</i> et <i>JrZFP2</i>	

Figure 10 : Cinétique des réponses cellulaires et physiologiques observées dans les deux premières heures suivant une sollicitation mécanique (adaptée de Telewski, 2006).

IV- Les acteurs cellulaires précoces

Analyser la régulation de la mécanoperception chez les plantes nécessite de réduire au maximum le nombre d'étapes entre l'application du stimulus et la réponse étudiée. Nous nous sommes donc intéressés aux réponses cellulaires précoces, c'est-à-dire celles intervenant dans un délai inférieur à une heure au cours de la réponse thigmomorphogénétique. La figure 10 inspirée de la revue de Telewski (2006) tente de replacer ces différents acteurs cellulaires de manière temporelle en fonction de certaines réponses physiologiques. Cette partie présente les données bibliographiques concernant les réponses cellulaires les mieux caractérisées à ce jour.

4.1- L'intervention du calcium

4.1.1- *Les sollicitations mécaniques induisent des flux de calcium dans les cellules*

Dans la partie 3.2.1, nous avons vu que la plupart des études portant sur la mécanoperception au niveau cellulaire révèlent l'implication de canaux calciques (Ding et Pickard, 1993). Dans le cytosol des cellules, le Ca^{2+} se trouve à de faibles concentrations ($<1\mu\text{M}$) impliquant un export actif dans les espaces extracellulaires mais aussi un stockage dans les organites intracellulaires (vacuole, réticulum endoplasmique) pour maintenir une concentration cytosolique relativement constante. L'existence d'un tel gradient de concentration en Ca^{2+} permet une entrée massive et rapide de celui-ci grâce aux canaux calciques présents dans la membrane plasmique (Ding et Pickard, 1993) et dans les membranes des organites (Knight *et al.*, 1992). Cette augmentation rapide et transitoire de la concentration cytosolique en calcium constitue donc, pour la cellule, un signal chimique responsable du déclenchement de réponses adaptées à ce signal.

L'utilisation de plants d'*A. thaliana* transformés par l'aequorine a montré que le vent provoque une augmentation rapide (1 à 2 min), transitoire et dose-dépendante du calcium cytosolique. Cette signature calcique diffère de celle induite par le froid (Knight *et al.*, 1992 ; Legue *et al.*, 1997). Une augmentation immédiate de la concentration du Ca^{2+} cytosolique a été retrouvée chez d'autres espèces telles que *Nicotiana tabacum* (Trewavas et Knight, 1994) ou *Bryonia dioica* (Thonat *et al.*, 1993).

4.1.2- Les protéines capables de fixer le calcium et leur implication dans les réponses aux sollicitations mécaniques

L'entrée massive de calcium dans le cytosol favorise la formation de complexes calcium/protéines. Parmi ces protéines fixant le calcium au niveau intracellulaire, on retrouve des calmodulines (CaMs), les calcineurines B-like (CBLs) et les annexines (White et Broadley, 2003).

Parmi les premiers gènes identifiés dont l'expression est induite par une sollicitation mécanique figurent les gènes *TOUCH* (*TCH*) découverts chez *A. thaliana* (Braam et Davis, 1990). Trois de ces gènes (*TCH1-3*) codent des protéines de liaison au calcium de type calmodulines (CaM) ou CaM-like (CML) (Braam et Davis, 1990 ; Sistrunk *et al.*, 1994). Ces gènes, appelés *TOUCH* en raison de leur induction par une sollicitation mécanique de type toucher, sont également activés par le vent ou la blessure (Braam et Davis, 1990). Les gènes *TCH* présentent un intérêt important dans l'étude de la perception des signaux mécaniques car ils sont induits rapidement (10 à 30 minutes) et fortement (quantité d'ARNm multipliée par 100 par rapport à leur niveau de base) chez *A. thaliana* (Braam et Davis, 1990). L'analyse du génome d'*A. thaliana* a ensuite permis de montrer l'existence de 7 gènes codant des CaMs et de 50 gènes codant des CaMs-like (McCormack et Braam, 2003). Une analyse globale de type puce à ADN réalisée par Lee et ses collaborateurs (2005) sur des plantules d'*A. thaliana* indique qu'un seul gène *CaM* (*TCH1*) et que neuf gènes *CaM-like* (*TCH2* et *TCH3* notamment) présentent une surexpression 30 minutes après une sollicitation mécanique. Les travaux de Braam (1992) sur des cultures de cellules d'*A. thaliana* en suspension ont montré que l'ajout de calcium dans le milieu induisait l'expression du gène *TCH3* en absence de signal mécanique. De plus, l'expression de ce gène est inhibée en présence d'antagonistes du calcium (Polisensky et Braam, 1996). L'induction de l'expression des gènes *TCH* semble être due à l'entrée de calcium dans le cytosol qui suit l'application d'une sollicitation mécanique.

Hormis une régulation par le calcium, les travaux de Wright et ses collaborateurs (2002) ont mis en évidence l'intervention d'autres acteurs dans la régulation de l'expression de *TCH3*. La protéine EIN6 impliquée dans la réponse des plantes à l'éthylène (Ecker, 1995) ainsi que des activités kinases et phosphatases interviennent dans la régulation de l'expression de *TCH3* suite à l'entrée d'ions Ca^{2+} (Wright *et al.*, 2002). Ces résultats confirment la complexité de la réponse moléculaire des plantes aux sollicitations mécaniques.

Les calmodulines sont des protéines ubiquitaires capables de réguler l'activité de différentes enzymes mais aussi d'activer des facteurs de transcription quand elles sont associées à des ions Ca^{2+} (Klee et Vanaman, 1982 ; Roberts et Harmon, 1992 ; Reddy, 2001). L'induction de leur expression ainsi que l'entrée de calcium dans les cellules suite à une sollicitation mécanique font donc de ces protéines des acteurs précoces importants de la réponse thigmomorphogénétique des plantes.

Toutefois, tous les gènes *TCH* sont régulés par d'autres sollicitations environnementales telles que l'obscurité ou les chocs thermiques (Braam et Davis, 1990 ; Polisensky et Braam, 1996 ; Braam *et al.*, 1997). Bien que très précoces, la régulation de ces gènes est donc complexe et leur rôle précis dans la transduction du signal mécanique n'est pas encore élucidé.

4.2- La production d'espèces activées de l'oxygène

Dans le cas d'un stimulus mécanique comme dans le cas d'autres types de stress environnementaux, la réponse peut aussi se traduire au niveau cellulaire par la production d'espèces activées de l'oxygène ou EAO (figure 10 ; Yahraus *et al.*, 1995 ; Gus-Mayer *et al.*, 1998). Après une stimulation mécanique lésante (blessure, brûlure), Orozco-Cardenas et Ryan (1999) observent une accumulation d'EAO dont le peroxyde d'oxygène (H_2O_2) dans les feuilles de tomate. De même, une stimulation mécanique lésante, provoquée sur des feuilles de *Mesembryanthemum crystallinum*, induit une forte augmentation de la quantité d' H_2O_2 (Slesak *et al.*, 2008). Chez la tomate, suite à un frottement de la tige, toute une panoplie d'enzymes antioxydantes chargées de juguler la flambée oxydative est mise en place, dont les glutathion peroxydases (Herbette *et al.*, 2002). Van Breusegem et ses collaborateurs (2001) suggèrent un rôle des EAO comme régulateur de l'expression de certains gènes.

Enfin, Mori et Schroeder (2004) ont décrit un rôle des EAO dans l'activation des canaux calciques de la membrane plasmique, suggérant leur intervention dans l'entrée du calcium dans le cytosol des cellules. Cette relation entre les EAO et le calcium pourrait impliquer un fonctionnement commun dans la réponse des plantes aux signaux mécaniques (Chehab *et al.*, 2009).

4.3- Implication de l'éthylène

L'éthylène, hormone gazeuse impliquée dans les manifestations physiologiques des plantes en situation de stress, intervient également dans la réponse à des sollicitations mécaniques (figure 10). En effet, des études menées sur la bryone ont montré que le frottement d'un entre-nœud déclenche une production rapide d'éthylène 10 minutes après la sollicitation, la flambée éthylénique (Boyer *et al.*, 1983). D'autres travaux ont montré que l'ajout d'éthylène induisait des changements morphogénétiques identiques à ceux obtenus en réponse à une sollicitation mécanique (Erner et Jaffe, 1983).

La voie de biosynthèse de l'éthylène fait intervenir deux enzymes clés : l'ACC synthase et l'ACC oxydase qui transforment respectivement le précurseur S-adénosylméthionine en acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC), puis l'ACC en éthylène. Suite à la flexion de feuilles de *Vigna radiata*, Botella et ses collaborateurs (1995) ont observé une accumulation rapide (10 min) des ARNm de l'ACC synthase. Chez la tomate, le vent et le toucher déclenchent l'expression rapide et transitoire de gènes codant différentes isoformes d'ACC synthase (Tatsuki et Mori, 1999). L'expression des gènes codant l'ACC oxydase est aussi régulée par des sollicitations mécaniques. Chez le noyer, une augmentation de la quantité de transcrits d'ACC oxydase est observée dès 30 minutes après la flexion d'une tige (Crouzet, 2002).

Toutefois, le rôle de l'éthylène dans la réponse thigmomorphogénétique reste controversé. D'un côté, des mutants d'*A. thaliana* insensibles à l'éthylène (*etr1-3* et *ein2-1*) présentent une diminution de l'élongation des inflorescences et un retard de floraison identiques à ceux des plantes sauvages soumises à une sollicitation mécanique (Johnson *et al.*, 1998). Ces résultats indiquent que l'éthylène n'interviendrait pas dans l'induction des réponses étudiées. D'un autre côté, EIN6, protéine impliquée dans la réponse à l'éthylène participe à la régulation du gène *TCH3* (Wright *et al.*, 2002). Enfin, une étude récente réalisée sur des tabacs montre que des plants insensibles à l'éthylène ne présentent pas la même réponse thigmomorphogénétique au niveau de la biomasse aérienne que des plants sauvages (Anten *et al.*, 2006). Ces études suggèrent donc un rôle de l'éthylène dans la réponse des plantes aux sollicitations mécaniques.

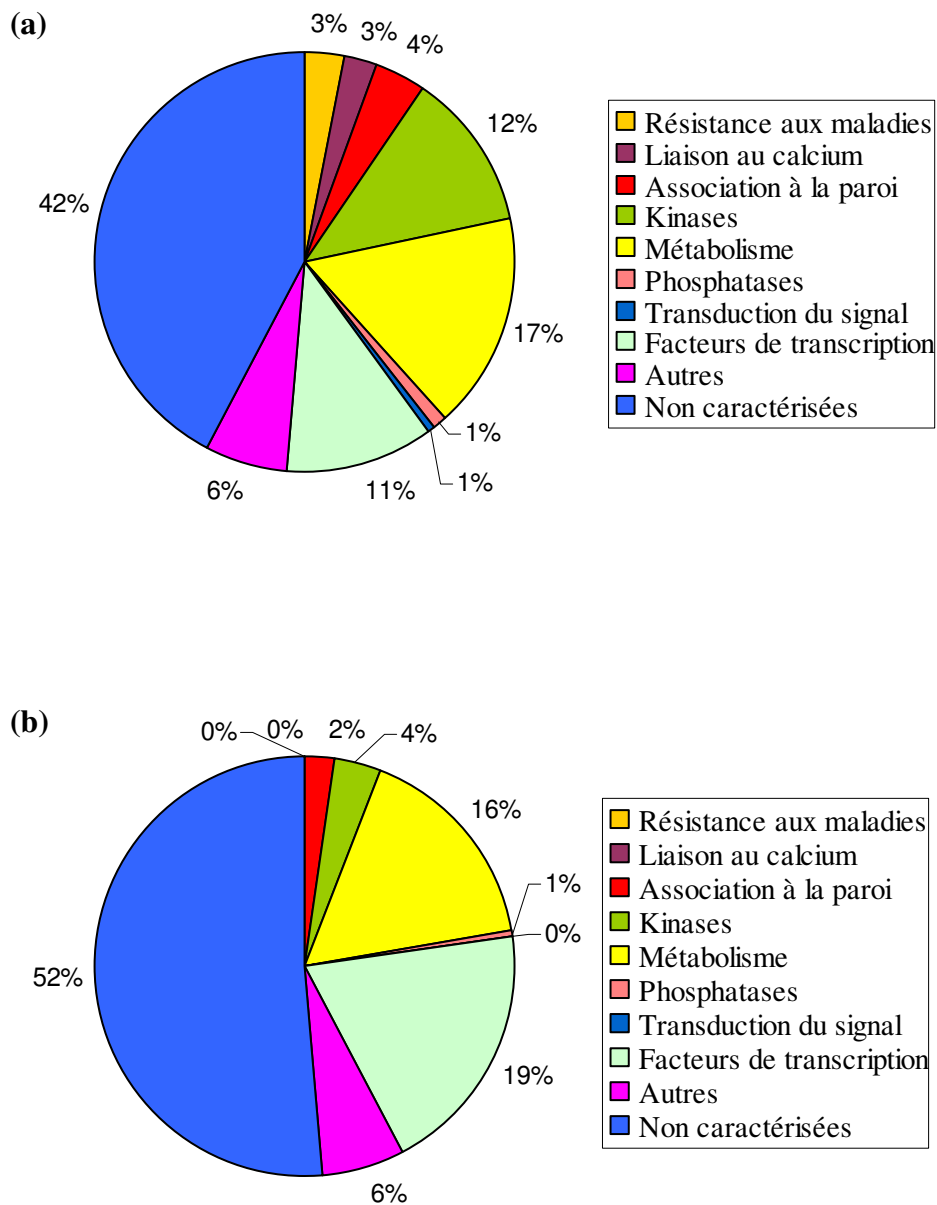


Figure 11 : Classement fonctionnel des gènes dont l'expression est modifiée 30 minutes après une sollicitation mécanique de type toucher chez *A. thaliana* (adapté des résultats de Lee *et al.*, 2005).

Le pourcentage représenté par chaque catégorie est donné pour les gènes dont l'expression est induite (a) ou inhibée (b).

4.4- Les gènes mécanosensibles

Une analyse globale réalisée sur des plantules d'*A. thaliana* (Lee *et al.*, 2005) montre que l'expression de plus de 2.5% des gènes est modifiée 30 minutes après une sollicitation mécanique de type toucher. Parmi ces gènes, 589 présentent une induction de leur expression et 171 présentent une inhibition (Lee *et al.*, 2005). L'analyse bioinformatique de ces séquences permet leur classement dans plusieurs catégories fonctionnelles (figure 11) : de nombreux gènes codent des protéines du métabolisme, des facteurs de transcription, des protéines de liaison au calcium, des protéines kinases et des transporteurs.

4.4.1- Les xyloglucanes endotransglycosylases/hydrolases (XET)

Parmi les gènes mis en évidence dans l'analyse de Lee et ses collaborateurs (2005), se trouve le gène *TCH4* découvert précédemment par Braam et Davis en 1990. Ce gène *TCH4* code une XET (Xu *et al.*, 1995). Les travaux de Lee et ses collaborateurs (2005) ont mis en évidence que sur les 33 gènes codant des XET chez *A. thaliana*, trois d'entre eux, parmi lesquels le gène *TCH4* (*XTH22*), présentent une induction de leur expression d'un facteur deux par rapport à un témoin non sollicité. Cette protéine est une enzyme capable de modifier la structure des xyloglucanes, composants de la paroi des cellules végétales, indiquant une intervention des sollicitations mécaniques dans la modification des propriétés mécaniques de la paroi cellulaire (Xu *et al.*, 1995).

De manière plus précise, les XETs provoquent un clivage interne des polymères de xyloglucanes et relient les extrémités réduites nouvellement formées à une autre chaîne de xyloglucanes (Smith et Fry, 1991 ; Fry *et al.*, 1992 ; Nishitani et Tominaga, 1992 ; Fanutti *et al.*, 1993 ; Saura-Valls *et al.*, 2006). Au niveau physiologique, différents travaux indiquent un rôle positif des XETs dans l'expansion cellulaire (McDougall et Fry, 1990 ; Takeda *et al.*, 2002).

Récemment, les travaux de Nishikubo et ses collaborateurs (2007) ont montré que les xyloglucanes sont des composants importants de la couche G qui apparaît dans le bois de tension qui se forme sur la face supérieure des axes inclinés chez les ligneux. Ce bois se caractérise en effet par la formation de fibres particulières, plus longues, appelées fibres G, présentant sur leur face interne une couche très épaisse d'aspect gélatineux pouvant remplir tout le lumen de la fibre. Mellerowicz et ses collaborateurs (2008) suggèrent que les

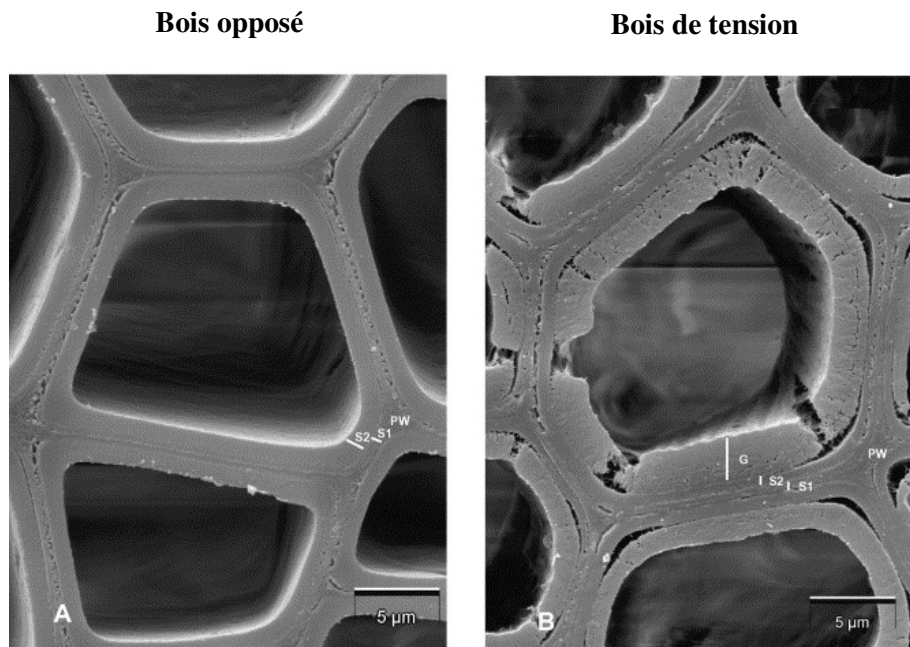


Figure 12 : Observation de fibres de bois opposé et de bois de tension en microscopie électronique à balayage (Pilate *et al.*, 2004).

PW : paroi primaire et lamelle moyenne ; S1 et S2 : couches de la paroi secondaire ; G : couche gélatineuse.

xyloglucanes joueraient un rôle de colle entre la couche G et la couche sous-jacente S2 (figure 12). Dans cette zone de contact entre les couches G et S2, on peut observer un important dépôt de xyloglucanes, associé à une forte activité des XETs, qui participerait au renforcement des connections entre ces deux couches (Nishikubo *et al.*, 2007). Même si, pour l'instant, aucune étude n'a montré la formation d'un tel bois suite à des flexions transitoires, on peut se poser la question de son existence dans le cas de telles sollicitations.

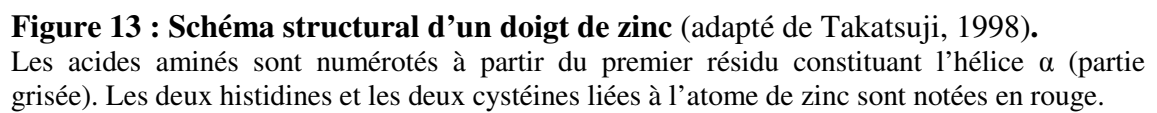
4.4.2- Les facteurs de transcription et les protéines kinases

D'autres gènes intéressants dont l'expression est modifiée suite à une sollicitation mécanique sont ceux codant des facteurs de transcription ou des protéines kinases, éléments importants dans les cascades de transduction de messages. Chez *A. thaliana*, 66 des 1601 gènes codant des facteurs de transcription présentent une induction de leur expression 30 minutes après une sollicitation mécanique, alors que 33 autres de ces acteurs de transcription sont inhibés (Lee *et al.*, 2005). En ce qui concerne les protéines kinases, 72 des 1111 gènes présents chez *A. thaliana* sont induits par le toucher, et seulement six d'entre eux sont inhibés (Lee *et al.*, 2005). Mis à part une analyse plus approfondie de l'expression des gènes de type CaM ou XET, cette étude globale n'apporte pas d'informations sur la localisation ou la cinétique d'expression des nombreux autres gènes nouvellement identifiés en réponse au stress mécanique.

Concernant les facteurs de transcription, une étude menée par une approche de type AFLP-cDNA a permis l'isolement chez le noyer d'un gène nommé *JrZFP2*, codant un facteur de transcription à deux doigts de zinc de la famille des protéines Cys2/His2 (C2H2-ZFP). L'expression de ce gène est induite rapidement et localement après une flexion contrôlée de la tige (Leblanc-Fournier *et al.*, 2008). La régulation de son expression est plus sensible à une flexion qu'à d'autres stress abiotiques de type froid ou salin. Après analyse, deux gènes (*ZAT10* et *ZAT12*) homologues de *JrZFP2* chez *A. thaliana* figurent dans la liste des 10 gènes dont l'expression est la plus fortement modifiée 30 minutes après le toucher (Lee *et al.*, 2005). Par ailleurs, bien que faisant partie d'une famille multigénique (comme CaM, CML ou ACS), les séquences nucléiques de ces gènes codant des protéines de type C2H2-ZFP présentent des régions très variables permettant de suivre individuellement l'expression de chaque membre. Enfin, sa fonction de facteur de transcription ouvrait la perspective d'accéder à un réseau de gènes sous son contrôle. L'ensemble de ces caractéristiques nous a encouragés à considérer ce

membre de la famille des facteurs de transcription de type C2H2-ZFP chez le noyer comme un marqueur moléculaire intéressant de la mécanoperception.

La partie suivante présente la structure et les données bibliographiques concernant la fonction et quelques caractéristiques de ces facteurs de transcription de type C2H2-ZFP.



V- Les facteurs de transcription à doigts de zinc de type Cys2/His2 (C2H2-ZFP)

Les protéines à doigts de zinc de type C2H2-ZFP ont été découvertes pour la première fois chez le xénope (*Xenopus laevis*) (Miller *et al.*, 1985). Elles constituent une classe importante de facteurs de transcription eucaryotiques (Englbrecht *et al.*, 2004). En effet, des analyses *in silico* des séquences génomiques ont montré que les gènes codant des protéines C2H2-ZFP représentent environ 3% des séquences codantes chez les mammifères (Bateman *et al.*, 2004). Chez les végétaux, la proportion de gènes codant des protéines C2H2-ZFP est relativement plus faible. Des études ont été menées sur plusieurs espèces. Elles ont montré que ces protéines comptent 176 membres chez *A. thaliana* (Englbrecht *et al.*, 2004) et 189 membres chez *Oriza sativa* (Agarwal *et al.*, 2007). Une étude plus récente réalisée chez *Triticum aestivum* a permis d'identifier 47 gènes codant une classe particulière de ces protéines (Kam *et al.*, 2008).

5.1- Caractérisation et fonctionnement des protéines à doigts de zinc de type C2H2-ZFP

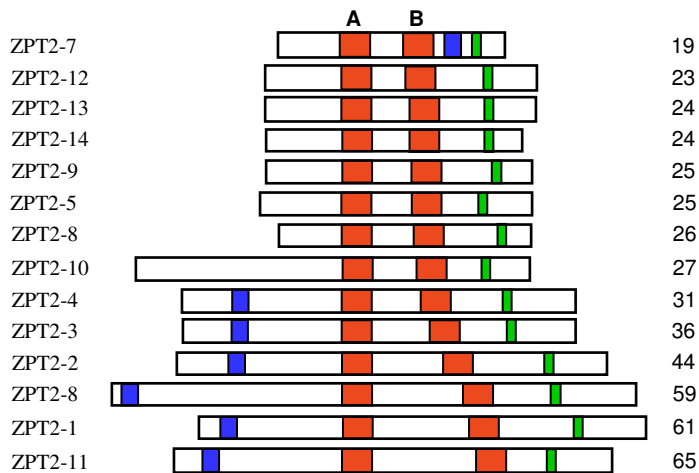
5.1.1- Caractéristiques générales et classification

Les protéines C2H2-ZFP sont caractérisées par une séquence **CX₂CX₃FX₅LX₂HX₃H**, dans laquelle deux histidines et deux cystéines interagissent de manière tétraédrique avec un atome de zinc pour former une structure compacte en forme de doigt (figure 13). Des études structurales menées sur la protéine ZIF268 de souris (*Mus musculus*) ont permis de montrer que les doigts de zinc ainsi formés sont capables de se fixer de manière séquence spécifique sur le grand sillon de la double hélice d'ADN (Pavletich et Pabo, 1991 ; Choo et Klug, 1997).

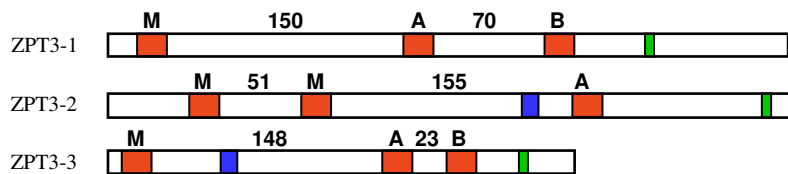
Chez les plantes, la première protéine à doigts de zinc de type C2H2-ZFP a été découverte chez le pétunia par Takatsuji et ses collaborateurs en 1992. Cette protéine dénommée ZPT2-1 interagit avec la région promotrice du gène codant la 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS), indiquant une activité de facteur de transcription de ZPT2-1 (Takatsuji *et al.*, 1992). Par la suite, d'autres protéines C2H2-ZFP ont montré une activité en tant que facteur de transcription. C'est le cas notamment de la protéine

Protéines à 2 doigts de zinc

Espacement



Protéines à 3 doigts de zinc



Protéines à 4 doigts de zinc

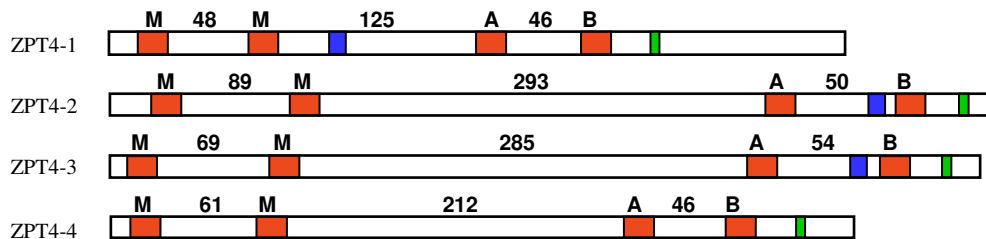


Figure 14 : Schéma structural des premières protéines de type C2H2-ZFP isolées chez le pétunia (adapté de Takatsuji, 1999).

Pour chaque protéine représentée, les doigts de zinc sont représentés par des rectangles rouges. Les autres motifs représentés sont les DLN-box (rectangles verts) et les L-box (rectangles bleus). L'espacement en acides aminés entre les doigts de zinc est indiqué pour chacune des protéines.

WZF1 du blé (Sakamoto *et al.*, 1993), et de différentes protéines d' *A. thaliana* telles que SUPERMAN (Sakai *et al.*, 1995) et STZ (Sakamoto *et al.*, 2004).

Si le motif de base CX₂CX₃FX₅LX₂HX₃H se retrouve chez toutes les protéines à doigts de zinc de type C2H2, il existe tout de même une variabilité importante de ces protéines entre espèces, mais aussi au sein d'une même espèce.

En 1998, différentes études menées chez le pétunia avaient permis la découverte de 30 protéines C2H2-ZFP (Kubo *et al.*, 1998 ; Takatsuji, 1998). Les protéines isolées à l'époque comportent de un à cinq doigts de zinc et présentent deux caractéristiques structurales qui les différencient de celles retrouvées chez les autres eucaryotes. Ainsi, le nombre d'acides aminés séparant deux motifs en doigts de zinc adjacents s'est avéré très différent entre les plantes et les animaux. En effet, l'écartement entre deux doigts de zinc est de 6 à 8 acides aminés dans les protéines animales alors qu'il est plus long et plus variable dans les protéines végétales étudiées, de 19 à 293 acides aminés (Kubo *et al.*, 1998 ; Takatsuji, 1998 ; figure 14). De plus, les protéines végétales présentent, pour la plupart, un motif QALGGH très conservé au niveau de leurs doigts de zinc, motif qui est essentiel à l'activité de liaison du facteur de transcription à l'ADN (Kubo *et al.*, 1998).

Plus récemment, une approche *in silico* réalisée par Englbrecht et ses collaborateurs (2004) a permis une description phylogénique précise des 176 protéines C2H2-ZFP retrouvées chez *A. thaliana*. La classification, basée sur la nature de la séquence des doigts de zinc ainsi que sur la distance séparant ces doigts, a permis un regroupement de ces protéines en trois grands groupes A, B et C (Englbrecht *et al.*, 2004). Les groupes A et B rassemblent des protéines proches de celles retrouvées chez les animaux et contenant des doigts de zinc répétés en tandem ne contenant pas le motif QALGGH. Ces deux groupes représentent seulement 20% des protéines C2H2-ZFP d'*A. thaliana*. Le groupe auquel nous nous sommes plus particulièrement intéressés est le groupe C comprenant la grande majorité des protéines C2H2-ZFP caractérisées par la présence d'un ou plusieurs doigts de zinc dispersés aléatoirement. Ce groupe a été séparé en plusieurs sous-groupes C1, C2 et C3, notamment le sous-groupe C1 qui rassemble 77 protéines. Les protéines C2H2-ZFP formant ce sous-groupe contiennent toutes le motif QALGGH spécifique des végétaux (Englbrecht *et al.*, 2004). La classification des protéines, au sein du groupe C1, est basée sur une comparaison des séquences en acides aminés entourant le motif QALGGH. La protéine codée par *JrZFP2* appartient à ce groupe C1 et contient le motif QALGGH dans ses deux doigts de zinc (Leblanc-Fournier *et al.*, 2008).

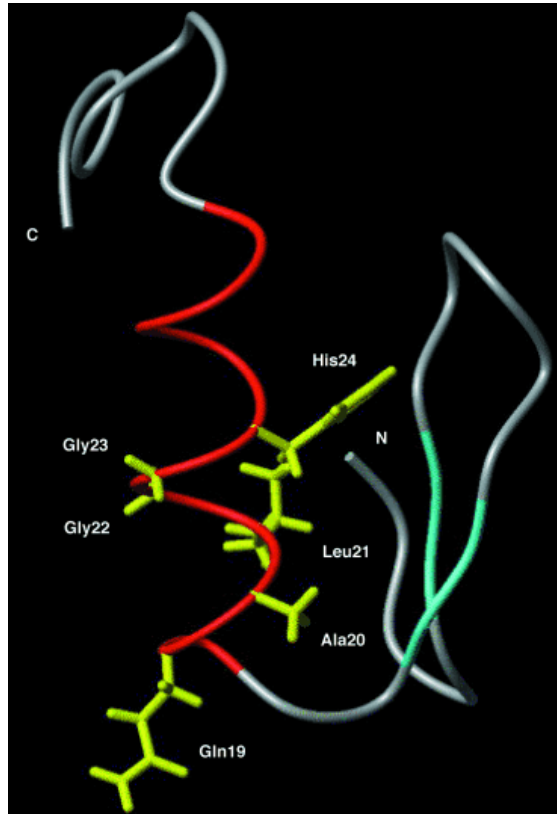


Figure 15 : Structure tertiaire d'un doigt de zinc (Isernia *et al.*, 2003).
 Les chaines latérales des Gln19, Ala20, Leu21, His24 et les protons H des Gln22 et Gln23 sont en jaune. Les feuillets β sont représentés en vert et l'hélice α est colorée en rouge.

5.1.2- Les motifs structuraux caractéristiques des protéines C2H2-ZFP du sous-groupe C1

Afin de mieux comprendre le fonctionnement des protéines du sous-groupe C1 nous nous sommes attachés à présenter les différents motifs plus ou moins bien conservés qui les composent.

Comme nous venons de le dire, les protéines du sous-groupe C1 contiennent un motif QALGGH très conservé situé au niveau des doigts de zinc. Différentes études indiquent que c'est par l'intermédiaire de ce motif que semble se faire la liaison à l'ADN (Takatsuji et Matsumoto, 1996 ; Yoshioka *et al.*, 2001). Les protéines C2H2-ZFP sont capables de se fixer à des fragments d'ADN comportant deux séquences de type AGT, disposées en tandem. Il a été montré que l'affinité de la liaison du facteur de transcription à l'ADN est modifiée par la nature de la séquence située entre ces deux motifs AGT (Takatsuji et Matsumoto, 1996 ; Takatsuji, 1999). Une étude structurale de l'unique doigt de zinc de la protéine SUPERMAN d'*A. thaliana* a été réalisée par Isernia et ses collaborateurs en 2003. Ces travaux ont permis de modéliser la structure tertiaire de ce doigt de zinc (figure 15), montrant ainsi que le motif QALGGH se situe entièrement au niveau de l'hélice α qui se lie à l'ADN. Plus spécifiquement, trois des six acides aminés de ce motif (en positions +2, +3 et +6) réaliseraient spécifiquement ces contacts (Isernia *et al.*, 2003).

De nombreuses protéines C2H2-ZFP de type C1 sembleraient avoir une action de répression de la transcription (Ohta *et al.*, 2001). La plupart des protéines qui répriment la transcription contiennent un motif EAR (ERF-associated Amphilic Repressor) (Uehara *et al.*, 2005 ; Kazan, 2006). Ce motif nommé DLN-box (L/F DLN L/F) est retrouvé chez les protéines du sous-groupe C1, ce qui leur confère une activité de répression (Sakamoto *et al.*, 2004 ; Ciftci-Yilmaz *et al.*, 2007).

Hormis ces motifs QALGGH et EAR, les protéines du sous-groupe C1 contiennent également d'autres motifs conservés dont le rôle potentiel est plus ou moins bien décrit. On retrouve ainsi un signal de localisation nucléaire putatif (B-box) du côté C-terminal ainsi qu'une région hydrophobe riche en leucines (L-box) qui pourrait être impliquée dans des interactions protéine-protéine indiquant ainsi un autre rôle potentiel des protéines de ce sous-groupe (Sakamoto *et al.*, 2000).

5.2- Rôles biologiques des protéines à doigts de zinc de type C2H2-ZFP du sous-groupe C1

Chez les plantes, la caractérisation fonctionnelle de nombreuses protéines C2H2-ZFP a été réalisée. Les différentes études ont permis de montrer leur intervention dans de nombreux processus biologiques, notamment au niveau du développement, mais aussi dans la réponse aux stress abiotiques.

5.2.1- Un rôle important dans les processus de développement

Chez les végétaux, les protéines C2H2-ZFP de type C1 sont impliquées dans les processus développementaux de divers organes. Chez le pétunia, l'orthologue de la protéine SUPERMAN d'*A. thaliana* intervient dans la morphogenèse des organes floraux (Nakagawa *et al.*, 2004). Des pétunias transgéniques surexprimant le gène *LIF* (*Lateral shoot Inducing Factor*) codant une protéine à doigts de zinc présentent des ramifications plus développées et une taille plus petite que des plantes sauvages (Nakagawa *et al.*, 2005). La surexpression du gène *LIF* se traduit également par une diminution du nombre de cellules dans la tige, les feuilles et les fleurs, accompagnée d'une augmentation de la taille des cellules (Nakagawa *et al.*, 2005). Chez *A. thaliana*, les gènes *JAGGED* et *NUBBIN* stimulent la croissance des sacs polliniques ainsi que celle de la paroi des carpelles entourant les ovules (Dinneny *et al.*, 2006). Ces gènes stimulent également la différenciation de certaines cellules de la paroi des carpelles et assurent la mise en place d'un nombre correct de couches cellulaires. Toujours chez cette même espèce, la protéine AtCZS réprime l'expression du gène *FLC* (FLOWERING LOCUS C), un régulateur négatif de la floraison (Krichevsky *et al.*, 2007).

5.2.2- Intervention dans les réponses aux stress abiotiques

Parmi les protéines de type C1 contenant deux doigts de zinc, la plupart ont été impliquées dans la réponse et l'adaptation des plantes à différents stress abiotiques. Ainsi, des travaux réalisés chez *A. thaliana* ont permis l'identification d'un facteur STZ (Salt Tolerance Zinc finger) conférant à des levures une tolérance accrue aux sels, LiCl et NaCl (Lippuner *et al.*, 1996). D'autres travaux réalisés sur des plantes transgéniques d'*A. thaliana* surexprimant les gènes *ZAT10* et *ZAT7* codant des protéines C2H2-ZFP ont montré une amélioration de leur résistance à un stress de type salin (Mittler *et al.*, 2006 ; Ciftci-Yilmaz *et al.*, 2007). De même,

la surexpression des gènes *ZPT2-3* du pétunia et *STZ* d'*A. thaliana* induits lors d'un stress hydrique se traduit par une meilleure résistance des plantes à la sécheresse (Sugano *et al.*, 2003 ; Sakamoto *et al.*, 2004). Enfin, il a été montré que le gène *ZFP182* isolé chez le riz joue également un rôle dans la tolérance des plantes à un stress salin (Huang *et al.*, 2007).

Chez *A. thaliana*, de nombreuses protéines C2H2-ZFP sont impliquées dans les réponses au froid et à la sécheresse (Seki *et al.*, 2002 ; Vogel *et al.*, 2005). En 2006, Chinnusamy et ses collaborateurs ont présenté l'intervention de trois protéines C2H2-ZFP (*AZF2*, *ZAT10* et *ZAT12*) dans la réponse au froid chez *A. thaliana*. Ainsi, chez des plantes transgéniques surexprimant *CBF3*, un gène codant un facteur de transcription impliqué dans les réponses au froid, l'expression du gène *STZ* (également impliqué dans la réponse à un stress salin) est augmentée (Maruyama *et al.*, 2004). Au contraire, une inhibition de l'expression du gène *CBF3* se traduit par une diminution significative de l'expression de *STZ* et *AZF2* en réponse au froid comparé à des plantes sauvages (Chinnusamy *et al.*, 2003). Chez le soja, le gène *SCOF-1* inductible par le froid améliore la tolérance des plantes à ce dernier (Kim *et al.*, 2001).

Enfin, d'autres protéines sont induites par un stress de type blessure. En effet, une blessure réalisée sur des feuilles de pétunia, induit l'expression du gène codant le facteur de transcription *ZPT2-3* en 15 minutes (Sugano *et al.*, 2003).

Les différentes études réalisées jusqu'à présent montrent l'importance des protéines à doigts de zinc de type C2H2-ZFP dans le processus d'acclimatation des plantes à de nombreux stress abiotiques. Contrairement aux protéines participant aux processus de développement qui contiennent un seul doigt de zinc, les protéines C2H2-ZFP intervenant dans les réponses aux stress abiotiques sont principalement des protéines à deux doigts de Zinc.

5.2.3- Spécificité d'expression des différentes isoformes

Comme nous l'avons cité précédemment, dans chaque espèce, les protéines C2H2-ZFP sont représentées par des familles multigéniques de grande taille. Il n'apparaît pas de spécificité de réponse d'un membre de la famille multigénique vis-à-vis d'un seul type de stress. En effet, les différentes études menées révèlent que certains de ces gènes s'expriment en réponse à des stimuli multiples. C'est le cas notamment de *ZAT12* qui répond à de nombreux stress abiotiques (stress froid, stress osmotique, stress salin) mais aussi biotiques (Davletova *et al.*, 2005 ; Mittler *et al.*, 2006). Le gène *ZPT2-3* du pétunia est induit non

seulement par des stimuli mécaniques lésants mais aussi par le froid, la sécheresse et les métaux lourds (Sugano *et al.*, 2003). Chez *A. thaliana*, trois autres gènes induits rapidement (30 minutes) en réponse à un stress salin ont été clonés. En 2000, Sakamoto et ses collaborateurs ont montré que deux de ces gènes sont aussi induits rapidement (30 minutes) en réponse à un stress froid, et que le niveau d'expression du troisième est fortement augmenté 30 minutes après un traitement à l'acide abscissique (ABA).

VI- Objectifs de la thèse

Les différentes études qui ont été menées jusqu'à présent sur la perception et la réponse des plantes aux sollicitations mécaniques ont permis (i) de montrer l'existence d'une réponse physiologique des plantes suite à une sollicitation mécanique (Boyer, 1967), (ii) de caractériser la cinétique de réponse de croissance longitudinale à court terme (Coutand *et al.*, 2000). Les travaux réalisés ont également (iii) montré que la variable mécanique perçue, dans le cas de la croissance longitudinale est la déformation (Coutand et Moulia, 2000), (iv) permis d'établir un modèle biophysique de la mécanoperception, (v) mis en évidence l'implication d'un nombre relativement important d'acteurs moléculaires (Chehab *et al.*, 2009), et (vi) permis l'identification d'un gène *JrZFP2* codant une protéine à doigts de zinc de type Cys2/His2 dont l'expression est rapidement induite suite à une flexion transitoire (Leblanc-Fournier *et al.*, 2008).

Si on replace maintenant les plantes dans les conditions écologiques, elles sont constamment soumises à des sollicitations mécaniques. Comme nous l'avons vu dans l'introduction générale, pour croître dans un environnement mécanique fluctuant, une plante, et *a fortiori* un arbre, doit pouvoir mesurer les effets mécaniques du vent sur sa structure et adapter ainsi sa croissance.

Différentes questions restent encore à résoudre concernant la régulation de la mécanoperception chez les végétaux : les hypothèses du modèle de mécanoperception sont-elles valides ? Y-a-t-il une acclimatation des plantes, c'est-à-dire une modification de leur réponse face aux sollicitations mécaniques multiples ? Existe-t-il une période de désensibilisation et donc un effet de la fréquence de sollicitation ?

Pour répondre à ces questions, il faut être capable de décrire précisément la réponse des plantes à une sollicitation mécanique unique et de quantifier le stimulus appliqué. Dans le cas d'une flexion transitoire de la tige, cette quantification est possible en utilisant des concepts de théorie des poutres et le modèle intégratif de la somme des déformations décrit chez la tomate par Coutand et Moulia (2000). Ce modèle nécessite cependant d'être validé au niveau local, c'est-à-dire sur une réponse précoce après le stimulus, afin de réduire le nombre d'étapes entre le signal et la réponse.

Avant d'aborder le phénomène de régulation de la mécanoperception, nous avons d'abord cherché à valider les hypothèses du modèle de mécanoperception. Dans ce but, nous

avons recherché un marqueur précoce de la réponse. La première partie de ce travail de thèse a consisté à valider le gène *PtaZFP2*, membre de la famille des protéines de type C2H2-ZFP et homologue de *JrZFP2* du noyer, comme marqueur moléculaire précoce de la réponse thigmomorphogénétique chez le peuplier.

La deuxième partie de ce travail présente la validation du modèle intégratif de mécanoperception au niveau de deux réponses locales : l'une moléculaire (expression du gène *PtaZFP2*) et l'autre physiologique (croissance en diamètre de la tige dans la zone sollicitée).

Sachant quantifier les réponses physiologiques et moléculaires à une flexion unique chez le peuplier, nous avons, dans la troisième partie, abordé les phénomènes d'acclimatation des plantes aux stimuli mécaniques en analysant la réponse de jeunes peupliers à des flexions répétées appliquées à différentes fréquences.

Enfin, dans le but d'étudier le rôle de *PtaZFP2* et de le replacer temporellement vis-à-vis des autres réponses thigmomorphogénétiques, nous avons produit des plantes transgéniques présentant une expression modifiée de ce gène. Ainsi, le dernier chapitre de cette thèse présente les résultats préliminaires concernant l'étude de ces plantes transgéniques.

Résultats

Chapitre 1

*Caractérisation du gène
PtaZFP2 et étude de son
expression en réponse à une
flexion et à différents stress
abiotiques*

La première partie de ma thèse a consisté à rechercher un acteur moléculaire précoce pour tester la validité du modèle de mécanoperception proposé par Coutand et Moulia (2000) sur une réponse cellulaire locale, c'est-à-dire dans la zone où a lieu la sollicitation mécanique. Comme je l'ai évoqué dans la synthèse bibliographique, les acteurs impliqués dans le complexe de mécanoperception chez les plantes ne sont pas encore précisément identifiés. Pour pouvoir tester le modèle intégratif proposé nous avons donc commencé par rechercher un marqueur de la mécanoperception dans les réponses cellulaires précoces. Ne disposant pas d'outils permettant le suivi des modifications des signatures calciques cytosoliques tels que des plants de peuplier transformés par l'aequorine, nous nous sommes intéressés aux gènes précocement induits par une sollicitation mécanique.

Parmi les gènes les mieux caractérisés dans la littérature figurent les gènes *TOUCH* codant des CaMs ou des CaMs-like (Braam *et al.*, 1997) et les gènes de la voie de la biosynthèse de l'éthylène (Arteca et Arteca, 1999). Chez la tomate, il a été montré que les gènes codant les calmodulines sont exprimés localement mais également à distance de la zone sollicitée (Depège *et al.*, 1997). Le rôle de l'éthylène dans la réponse des plantes aux sollicitations mécaniques n'est pas clair et sujet à controverse (Johnson *et al.*, 1998 ; Chotikacharoensuk *et al.*, 2006). Au laboratoire, les travaux menés sur *Juglans regia*, ont permis l'isolement d'un gène nommé *JrZFP2* codant un facteur de transcription à deux doigts de zinc de type C2H2-ZFP. L'expression de ce gène étant induite rapidement et localement après une flexion contrôlée de la tige, il est apparu comme étant un candidat intéressant pour l'étude et la compréhension de la mécanoperception chez les plantes (Leblanc-Fournier *et al.*, 2008).

Dans ce but, nous avons cloné un homologue de ce gène dans notre modèle d'étude, un hybride de *Populus tremula* et de *Populus alba*, le cultivar INRA 717-1B4. La séquence complète du génome de peuplier (*Populus trichocarpa*) n'étant pas encore disponible au commencement de ces travaux, nous avons obtenu ce gène par amplification PCR à l'aide d'amorces dégénérées ciblées au niveau de régions conservées des protéines de type C2H2-ZFP de plusieurs espèces (deuxième doigt de zinc et région DLN). Afin de cloner une isoforme la plus proche possible de celle isolée chez le noyer et d'enrichir la population d'ARNs totaux en ARNm codés par des gènes mécanosensibles, ces expériences ont été effectuées sur des ARNs issus de tiges récoltées 30 minutes après une flexion. Dans un premier temps, cette approche nous a permis d'isoler un fragment partiel d'ADNc de 300 pb présentant de fortes homologies avec la séquence de *JrZFP2*.

La suite du travail a consisté à cloner la séquence codante complète et à étudier la régulation de l'expression de ce gène chez le peuplier suite à une sollicitation mécanique de type flexion transitoire. Ces travaux font l'objet de ce premier chapitre qui présente, notamment, l'analyse de la séquence codante de *PtaZFP2* (*Populus tremula x alba* Zing Finger Protein 2). Nous avons également cloné une région promotrice de 1500 pb en amont de la séquence codante de *PtaZFP2* et analysé par bioinformatique les éléments *cis* potentiellement impliqués dans la régulation de l'expression de ce gène. Par la suite, nous avons caractérisé l'expression de *PtaZFP2* suite à l'application de deux types de sollicitations mécaniques (flexion et stimulus gravitropique) et en réponse à d'autres facteurs abiotiques (stress salin, froid, blessure et obscurité).

Dans la discussion, nous développons différents aspects traitant du rôle potentiel de *PtaZFP2* dans l'intégration des signaux abiotiques chez le peuplier.

Ce premier chapitre a fait l'objet d'une publication parue en janvier 2009 dans le journal *Tree Physiology*.

Characterization and expression analysis under bending and other abiotic factors of *PtaZFP2*, a poplar gene encoding a Cys2/His2 zinc finger protein

LUDOVIC MARTIN,¹ NATHALIE LEBLANC-FOURNIER,^{1,2} WASSIM AZRI,¹ CATHERINE LENNE,¹ CLÉMENCE HENRY,¹ CATHERINE COUTAND³ and JEAN-LOUIS JULIEN¹

¹ UMR547 PIAF, Univ Blaise Pascal, F-63177 Aubière, France

² Corresponding author (Nathalie.LebLANC@univ-bpclermont.fr)

³ UMR547 PIAF, INRA, F-63100 Clermont-Ferrand, France

Received June 18, 2008; accepted September 29, 2008; published online December 3, 2008

Summary In plants, mechanoperception and transduction of mechanical signals have been studied essentially in *Arabidopsis thaliana* L. and *Lycopersicon esculentum* L. plants, i.e., in nonwoody plants. Here, we have described the isolation of both the full-length cDNA and the regulatory region of *PtaZFP2*, encoding a member of Cys2/His2 zinc finger protein (ZFP) family in *Populus tremula* L. × *Populus alba* L. Time course analysis of expression demonstrated that *PtaZFP2* mRNA accumulated as early as 5 min in response to a controlled stem bending and is restricted to the organ where the mechanical stimulus is applied. The real-time quantitative RT-PCR experiments showed that *PtaZFP2* was also rapidly up-regulated in poplar stems in response to gravitropism suggesting that *PtaZFP2* is induced by different mechanical signals. Abundance of *PtaZFP2* transcripts also increased highly in response to wounding and to a weaker extent to salt treatment and cold, which is consistent with the numerous putative cis-elements found in its regulatory region. As in other species, these data suggest that Cys2/His2 ZFPs could function in poplar as key transcriptional regulators in the acclimation response to different environmental factors.

Keywords: C2H2 zinc finger putative transcription factor, environmental stresses, gravitropism, mechanical stress, *Populus*.

Introduction

Plants undergo continuous exposure to biotic and abiotic stresses in their natural environment (Fujita et al. 2006). Many abiotic stresses induce morphogenetic responses that comprise three components: (i) modification of cell

elongation, (ii) localized variation of cell division and (iii) alterations in cell differentiation status. The stress-induced morphogenetic response is postulated to be part of a general acclimation strategy whereby plant growth is redirected to diminish stress exposure (Potters et al. 2007). In the case of external loads such as wind or snow (Telewski 2006), the stress-induced morphogenetic response is called thigmomorphogenesis (Boyer 1967, Jaffe 1973). This includes reductions in height increment (Henry and Thomas 2002, Anten et al. 2005), dry mass increment (Niklas 1998) and seed production (Niklas 1998), and increases in diameter growth in stems (Boyer et al. 1986), root allocation (Crook and Ennos 1996, Coutand et al. 2008) and root growth (Jaffe and Forbes 1993). However, the nature and the extent of the responses vary between species and environmental conditions. When plants, mainly woody plants, are exposed to mechanical stimuli, generated by internal self-loading induced by growth or during fruit bearing, the morphogenetic response consisted of stem reorientation or orientation keeping in view the production of reaction wood (Almeras et al. 2004, Telewski 2006, Coutand et al. 2007).

The signal transduction pathway leading to thigmomorphogenesis is not clearly understood, although: (i) a unified hypothesis of mechanoperception in plants has been proposed (Telewski 2006) and (ii) the role of calcium as the second messenger in mechanical signal transduction is generally admitted (Knight et al. 1992, Depege et al. 1997). An increase in the intracellular calcium concentration is observed several minutes after wind treatment in *Arabidopsis thaliana* L. plants (Knight et al. 1992) and several calmodulin-like (TCH2 and TCH3) proteins are involved in mechanical response in *Arabidopsis* (for review, see Braam 2005). Moreover, a lot of reports support that mechanical stress responses in plants involved the reactive oxygen species signaling pathway (Depege et al. 1998, Apel

and Hirt 2004) and are hormonally mediated (Erner and Jaffe 1982, Boyer et al. 1983, Biro and Jaffe 1984). The plant hormone ethylene has received more attention because similar modifications of growth have been shown to result from either touch or exogenous applications of ethylene (Mitchell 1996). Nevertheless, the nature of ethylene's involvement in touch-induced responses remains unclear (Johnson et al. 1998, Chotikacharoensuk et al. 2006).

Recent studies have encouraged the identification of the common molecular strategy involved in the stress signaling networks, and among the several candidate molecules, the transcription factors are the promising candidates (Fujita et al. 2006). Numerous transcription factors involved in the regulation of many physiologic processes have been identified in plants and are classified according to their DNA-binding domains (Montiel et al. 2004). Transcription factors such as MADS-box, homeodomain, zinc finger (ZF), basic Leu-zipper, basic helix-loop-helix, MYB and MYC proteins have been found in both animals and plants (Riechmann et al. 2000). Among these transcription factors, Cys2/His2 (C2H2) zinc finger proteins (ZFPs) in plants are involved not only in DNA binding but also in RNA binding or protein-protein interactions (Gamsjaeger et al. 2007). They are involved in a wide range of developmental processes such as floral organogenesis, leaf initiation, lateral shoot initiation, gametogenesis and stress response (Takatsuji 1998, Englbrecht et al. 2004). A gene family of C2H2-type two zinc finger proteins (ZFP2) has been identified in *Petunia hybrida* L. (Kubo et al. 1998). Using systematic analysis of plant genomes, 176 proteins that contain one or more ZFs were described in *A. thaliana* (Englbrecht et al. 2004), and 189 members in *Oryza sativa* L. (Agarwal et al. 2007). The first ZFP2 protein was found in *Petunia* and named ZPT2-1. Takatsuji et al. (1992) had showed that ZPT2-1 interacts with the promoter region of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene. More recently, Sakamoto et al. (2004) had reported that four *Arabidopsis* ZPT2-related proteins (AZF1, AZF2, AZF3 and STZ) were localized in nuclei and bound to DNA in a sequence-specific manner (A(G/C)T repeat sequences). These four ZPT2-related proteins were shown to act as transcriptional repressors that down-regulate other transcription factors. Among the four genes, *AZF2* and *STZ* showed strong induction by dehydration, high salt, cold stress and abscisic acid (ABA) treatment.

We have recently isolated a ZFP gene from *Juglans regia* L. (*JrZFP2*) encoding a Cys2/His2-type ZFP2 (Leblanc-Fournier et al. 2008). In this study, RT-PCR analysis indicated that *JrZFP2* mRNA accumulation is rapidly and transiently induced in response to the controlled stem bending. The aim of the present study was to isolate the homolog of *JrZFP2* in *Populus tremula* L. \times *Populus alba* L. and to further clone the promoter to identify potential regulators of the gene. The expression of *PtaZFP2* was

studied in response to several abiotic factors (bending, cold, salt, wounding and gravity) to check its involvement in crosstalk between stress-signaling pathways. In *Arabidopsis*, 50% of touch-induced genes are also regulated by darkness (Lee et al. 2005). Therefore, we also tested the effect of darkness on *PtaZFP2* mRNA accumulation.

Materials and methods

Plant material and culture conditions

Hybrid poplars (*P. tremula* \times *P. alba*, clone INRA 717-1B4) were multiplied clonally in vitro on Murashige and Skoog medium (Murashige and Skoog 1962). When they reached a height of about 4 cm, poplar micropropagated shoots were gradually acclimatized on hydroponic solution (Morizet and Mingeau 1976). Then, they were kept in a controlled environment room: 16 h daylight, at 24 °C and 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (day) and 20 °C (night) with 70 \pm 10% relative humidity. Experiments were done on poplars that reached a height of about 35 \pm 4 cm with 20 internodes. Four days before each treatment, poplars were transferred on a new device in which they were attached a few centimeters above the collar, and some basal leaves were removed.

Environmental stress treatments

Mechanical stimulation was performed by rolling the stem basal part (10 cm above the collar) on a plastic tube of 32 mm diameter. The bent portion of the stem (3 cm long and of 4 \pm 0.5 mm diameter) was collected at different times (5, 10, 30 min and 1 h) after the mechanical stimulation for time course expression analysis. For *PtaZFP2* expression analysis in different poplar organs after stem bending, six types of organs were collected 1 h after stimulation, quickly frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C until analysis. Expression was studied on roots, basal leaves (2 cm above the bent part of the stem), apical leaves (below the apex), basal internodes (10 cm above the collar), apical internodes (1 cm below the apex), and apex of control and bent plants.

For gravitropic studies, poplars were artificially inclined at 35° from the vertical axis for 10, 20, 30, 45 min, 1, 3 or 6 h. The five internodes above the collar were then harvested from tilted and non-tilted plants, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C until RNA extraction.

In salt stress experiments, plants were treated with 200 mM NaCl. RNAs were extracted from poplar roots, basal internodes, basal leaves and apex 30 or 75 min after NaCl addition. To assess the effects of cold and dark stresses, plants were incubated at 4 °C in the light or at 24 °C in the dark, respectively, for 1 h and then the stem portions were removed and frozen in liquid nitrogen. In wounding experiments, poplar leaves were slashed with a razor blade and then incubated on a wet paper for 1 h.

RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNAs were extracted from about 150 mg of bent stems using CTAB extraction buffer as described by Chang et al. (1993) and then treated with RNase-free RQ1 DNase (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). RNA was quantified spectrophotometrically and checked out by agarose gel electrophoresis. First-strand cDNA was synthesized from 1 µg total RNA using oligodT and SuperScript III (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) following the protocol of the supplier.

cDNA cloning and promoter isolation

For cDNA cloning, two degenerated primers 5'-TTTCA (A/G)GC(A/G/T/C)TT(A/G)GG(A/G/T/C)GGTCA-3' and 5'-AGTGG(A/G/T/C)GT(A/G/T/C)AA(A/G)TT (A/G/T/C)AAATC-3' were designed in two Cys2/His2 ZF conserved regions. A 332 bp fragment was obtained after PCR amplification from bent stem cDNA. Using this sequence, two antisense-specific primers were designed: PZF1 5'-CAAGTTCCCAGTTGATTCCATGAGTTTGG-3' and PZF2 5'-TTGGCTTTGAAGGCGAATTAGGCAGCTTC-3' to clone *PtaZFP2* promoter sequence. Promoter isolation was performed using Universal Genome Walker kit (Clontech, St-Germain-en-Laye, France) on DNA that was isolated from poplar leaves using a CTAB technical extraction (Ziegenhagen et al. 1993). The products were then cloned in pGEM-T easy vector according to the manufacturer's conditions (pGEM-T easy vector system II, Promega) and sequenced by MilleGen company (Labège, France). The cloning sequence was submitted to PLACE database (<http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/>). This allowed us to reach 5'-untranslated region (UTR) of *PtaZFP2* cDNA also. The end of the coding sequence in 3' was obtained by RT-PCR using the specific primer PZF3 5'-ATGAAGA-GAGATAGAGAACAG-3' and an oligodT.

Northern blot hybridization

For Northern blot analysis, a *PtaZFP2* gene-specific probe of 287 bp was generated by PCR with a specific pair of primers Pe1S 5'-CGTGCGAGTCACAA GAAACC-3' and Pe1AS 5'-CACAGAACTCTCTTG CTGCT-3', labeled with α^{32} -P-dCTP using Ready-To-Go DNA labeling Beads kit (Amersham, Orsay, France) and then purified with Cleanmix kit (Euromedex, Mundolsheim, France) according to the manufacturer's recommendations. Total RNAs (15 µg) were separated by 1% agarose gel electrophoresis after denaturation with formaldehyde and blotted onto a nylon membrane Hybond-N+ (Amersham). The Northern hybridization was carried out with NorthernMax kit (Ambion, Huntingdon, UK). Membranes were then exposed to a phosphorimager screen (Kodak, Rochester, USA) for 4 h. Signal quantification was made using Quantify One software (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Student's *t* test was used to determine statistical significance.

Real-time quantitative RT-PCR experiments

The real-time quantitative RT-PCR amplifications were done using an iCycler IQ (Bio-Rad) and using SYBR green as a fluorescent dye. Each PCR reaction (30 µl) contained the following: cDNA (4 µl of 1:40 dilution of the first cDNA strands), PCR buffer (1X), MgCl₂ (1.66 mM), dNTP mix (200 µM of each), primers (0.3 µM of each), Platinum Taq DNA polymerase (0.5 unit, Invitrogen) and SYBR green I (1/1000, Sigma, St Quentin Fallavier, France).

After a heat step at 94 °C for 5 min, PCR cycling conditions were 40 cycles of denaturation (94 °C, 15 s), annealing (61 °C, 15 s) and elongation (72 °C, 20 s), ending by a final elongation step at 72 °C for 5 min.

PtaZFP2 transcripts were detected by amplifying 287 bp with primers Pe1S and Pe1AS. The reference gene *EF-1 α* (Elongation factor-1 α) transcripts were amplified using the primers EF1S 5'-GACAACCTAGGTACTACTGC ACTGTC-3' and EF1AS 5'-TTGGTGGACCTCTCGAT CATG-3'. Relative quantitative abundance (Qr) of *PtaZFP2* transcripts was calculated by comparison to the expression of *EF-1 α* using the delta-delta method mathematical model (McMaugh and Lyon 2003)

$$Qr = 2^{(C_{\text{control}} - C_{\text{treated}})_{\text{target}}} / 2^{(C_{\text{control}} - C_{\text{treated}})_{\text{reference}}}$$

Here, C is the cycle number of PCR. Specificity of amplification was confirmed by determining the melt curves for the PCR products at the end of each run and by using a gel electrophoresis. The real-time PCR amplifications were done in at least three independent experiments, and every run was carried out in triplicate. Student's *t* test was used to determine statistical significance.

RT-PCR analysis

To study the time course accumulation of *PtaACS*, *PtaTCH2* and *PtaZFP2* transcripts, PCR amplification was performed on 4 µl of 1:40 dilution of the first-strand cDNA. *PtaACS* is the ortholog of *Arabidopsis ACS6* gene encoding ACC synthase (Arteca and Arteca 1999). For *PtaACS* time course expression study, specific primers PtaACSS 5'-AAGCCTCCATTTGCANTCCTG-3' and PtaACSAS 5'-TTCAATATCTTCTGTAGTAT-3' were used. Amplification consisted of 30 cycles with the following conditions: 94 °C, 30 s; 50 °C, 30 s; and 72 °C, 30 s. *PtaTCH2* is the ortholog of *Arabidopsis TCH2* gene (Braam and Davis 1990). Specific primers PtaTCH2F 5'-TGAT CAAGATGGTGATGGTAATG-3' and PtaTCH2R 5'-CGCAAAAACATCAATGGAAA-3' were used for *PtaTCH2* time course expression study. Amplification was made with an annealing temperature of 60 °C, during 26 cycles. The same cDNA reactions were used to amplify *PtaZFP2* and the control *EF-1 α* with the specific primers described above. These amplifications were made with an annealing temperature of 61 °C, during 28 cycles for

PtaZFP2 and 21 cycles for *EF-1 α* . The PCR products were separated on a 2% agarose gel.

Results

Isolation and sequence analysis of *PtaZFP2*, a poplar ZFP encoding gene

To identify a C2H2-type ZFP2 encoding a gene homologous to *JrZFP2* which is involved in mechanosensing in *J. regia* (Leblanc-Fournier et al. 2008), we designed the

degenerated primers corresponding to the two conserved regions of different C2H2-type ZFP2. These primers allowed us to amplify a partial cDNA highly accumulated in poplar bent stems. After sequencing, specific primers were used to obtain the full-length cDNA, named *PtaZFP2* (Accession No. FM172949). Sequence analysis showed that this cDNA is 801 bp long from the ATG and contains a 3'-untranslated sequence of 210 bp including the poly A tail. It encodes a polypeptide of 197 amino acids (Figure 1A). Analysis of the deduced amino acid sequence indicated that this protein contained two canonical Cys2/

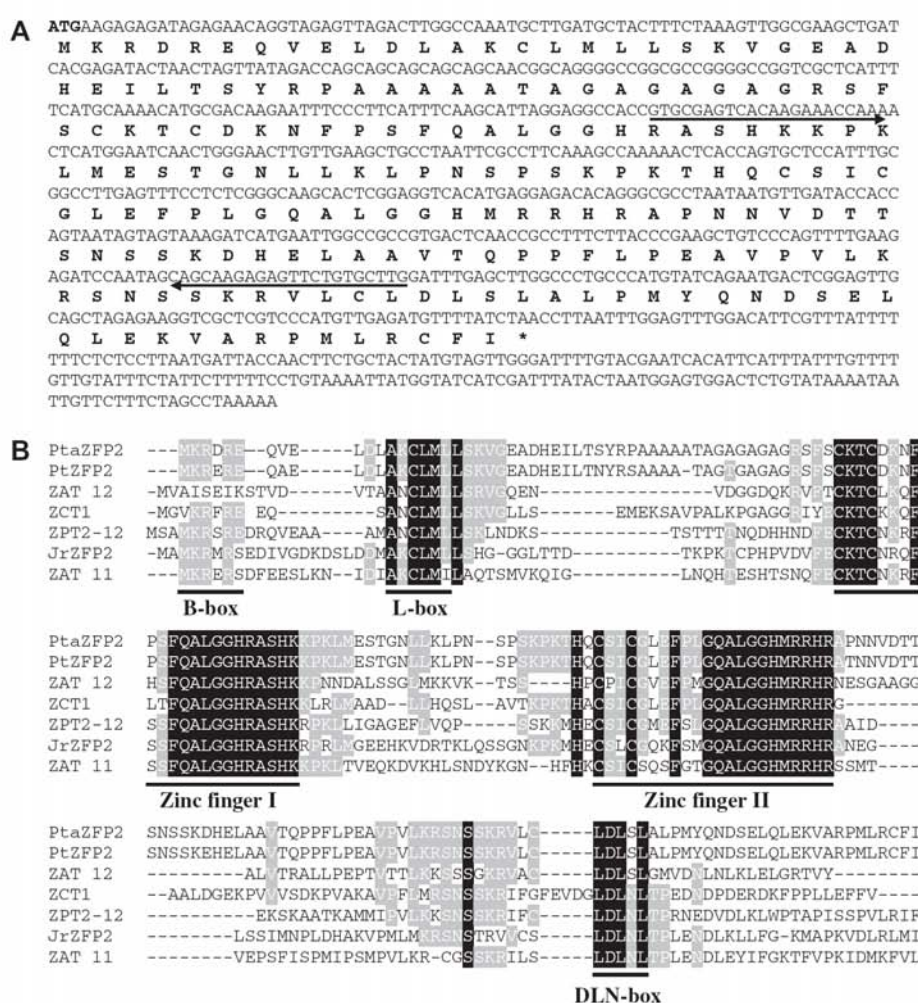


Figure 1. (A) Nucleotide sequence of *PtaZFP2* and its deduced amino acid sequence. Primers used for quantitative PCR are indicated by arrows. Codon stop is shown by an asterisk. (B) Comparison of the deduced amino acid sequence of the *P. tremula* \times *P. alba* ZFP *PtaZFP2* with ZFPs from *P. trichocarpa* (PtZFP2, corresponding to the model gene estExt_Genewise1_v1.C_LG_11393), *C. roseus* (ZCT1, Accession No. AJ632082), *P. hybrida* (ZPT2-12, Accession No. AB006599), *J. regia* (JrZFP2, Accession No. AJ937310), and *A. thaliana* (ZAT11, Accession No. NM129298 and ZAT12, Accession No. NM125374). Residues conserved among all seven sequences or at least four of seven are highlighted in black or gray, respectively. The two zinc finger motifs, partial B-box, L-box and DLN-box are underlined.

regions: a partial putative nuclear localization signal (B-box), a hydrophobic leucine-rich region (L-box) probably involved in protein-protein interaction, and a C-terminal region DLN-box. In PtaZFP2, the B-box and DLN-box are not entirely conserved.

Isolation and sequence analysis of PtaZFP2 promoter

To identify putative cis-elements that are responsible for *PtaZFP2* regulation, a 1500 bp region upstream of the start codon of the *PtaZFP2* gene was isolated by a genome walking strategy on *P. tremula* × *P. alba* genomic DNA. As shown in Figure 2, a PLACE Web Signal Scan analysis (Higo et al. 1999) revealed regulatory motifs common to other eukarvotic promoters.

In the first 1000 bp region of the *PtaZFP2* promoter, three GARE elements (TAACAA/GA-box) and two Pyrimidine boxes were identified, cis-elements related to gibberellin response in the case of the α -amylase encoding gene promoters (Jacobsen et al. 1995). We also detected

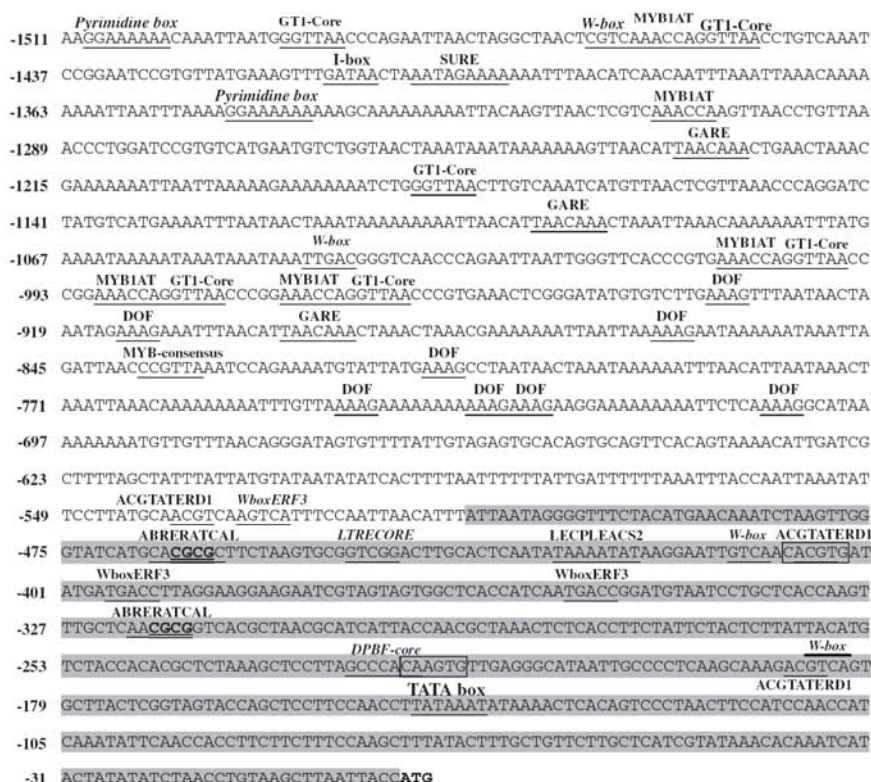


Figure 2. Nucleotide sequence of the 5'-flanking region containing the promoter and putative cis-acting elements of the *PtaZFP2* gene. The gray-colored sequence corresponds to the region showing high homology with the regulatory sequence of a homologous gene in *P. trichocarpa* genome. Motifs that are homologous to known regulatory cis-elements are underlined and their names are written in bold or in italic, when the motif was found in sense or antisense orientation, respectively. MYC-consensus motifs are framed, and sequences representing the GC-box are in bold. The numbering refers to distance relative to the ATG codon (+1).

eight DOF motifs ((A/T)AAAG) corresponding to the recognition core of Dof proteins (DNA binding with one finger), regulating the expression of plant genes in response to light, developmental stage and hormone treatment such as gibberellin (Washio 2001, Yanagisawa 2002). Another particular region corresponds to the three consecutive repetitions of MYB1(AT) and GT1 sites. The GT1-element was first identified as a light up-regulated element (Zhou 1999) but has also been found in the promoter regions of other genes such as the defence-related *PR-1a* tobacco gene where it may function as a repressor of gene expression (Buchel et al. 1999). MYB1(AT) sites are MYB recognition sites found in the promoters of the dehydration-responsive gene *rd22b* and many other genes in *Arabidopsis* (Abe et al. 1997). Nagano (2000) described that the important residues in the DNA-binding of GT1 factors and MYB proteins are well conserved. These results suggested that GT-factors arose in evolution from MYB proteins and could explain the vicinity of their DNA recognition site.

Blast analysis showed that the 500 bp region immediately upstream of the ATG codon shared more than 90% of homology with the upstream region of the model gene *estExt_Genewise1_v1.C_LG_I1393* of *P. trichocarpa* genome (data obtained from JGI database), whereas no significant similarity was found for the more distal part of this sequence. This 500 bp sequence immediately upstream of the ATG codon of *PtaZFP2* contains several cis-elements implicated in response to abiotic stress. The three ACG-TERD1 motifs detected in positions -539, -409 and -187 bp were described in the up-regulation of *erd1* gene in *Arabidopsis* by dehydration stress and dark-induced senescence (Simpson et al. 2003). At position -409 bp, this motif matches at the same position with an E-box element (CANNTG) and a MYC-consensus (AT) motif. This MYC-consensus site is the binding site of AtMYC2, a protein involved in cold responsiveness (Chinnusamy et al. 2003). Another MYC-binding site is detected at position -222 bp; this site is partially overlapping with a DPBF-core motif shown to be the binding core of bZip transcription factors whose expression is normally embryo-specific and can be also induced by ABA (Kim et al. 1997). The LTRECORE motif detected at position -449 bp in anti-sense orientation is the core of low temperature responsive element found in the *cor15a* gene (Baker et al. 1994).

The several W-box and WBOXNTERF3 elements are important motifs in response to wounding and pathogen response and show specific interaction with the transcription factors WRKYs (Nishiuchi et al. 2004, Ulker and Somssich 2004).

Two ABRE-like motifs (ABRERATCAL) are detected in positions -321 and -467 bp from the ATG. Kaplan et al. (2006) showed that a tetramer of this ABRE cis-element is sufficient to confer transcriptional activation in response to cytosolic Ca^{2+} transients. Furthermore, this cis-element overlaps with a CGCG-box [(A/C/G)CGCG(G/T/C)] identified as a specific binding site of

AtSR1, a protein containing a CaM-binding domain in the C-terminus (Yang and Poovaiah 2002). This CaM-regulated *AtSR* gene family responds differentially to multiple physical and chemical stimuli.

At position -431 bp from the ATG, the LECPLE-ACS2 element corresponds to a DNA sequence in tomato which is required for elicitor EIX responsiveness of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expression (*LeACS2*). A Cys protease that specifically binds to this cis-element in vitro was isolated (Matarasso et al. 2005).

Time course accumulation of *PtaZFP2* transcripts and localized expression after controlled stem bending

The accumulation of *PtaZFP2* mRNAs after controlled bending in poplar stems was investigated by semi-quantitative RT-PCR analysis. With our amplification conditions, no *PtaZFP2* transcripts were detected in the control plant stems (Figure 3). Bending induced the accumulation of *PtaZFP2* transcripts within 5 min. *PtaZFP2* transcripts highly accumulated 10–30 min after the stem bending, and the level of *PtaZFP2* transcripts slowly decreased 1 h after bending. Next, we compared the time course accumulation of *PtaZFP2* transcripts to that of *PtaACS* and *PtaTCH2*. *ACC synthase* encoding gene (*ACS*) is a primary response gene to mechanical stress involved in ethylene biosynthesis. *ACC synthase* mRNAs accumulate 10 min after the bending of *Vigna radiata* leaves (Botella et al. 1995). As shown in Figure 3, *PtaACS* transcripts accumulated 10 min after stem bending and reached a peak after 30 min. *TCH2* gene encoding calmodulin-like protein is induced 10 min after touch stimulation in *Arabidopsis* (Braam and Davis 1990). In poplar, bending induced the accumulation of *PtaTCH2* transcripts within 5 min.

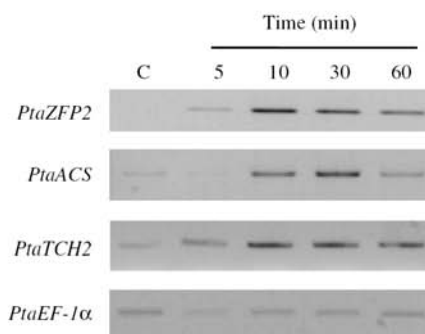


Figure 3. Time course accumulation of *PtaZFP2*, *PtaACS* and *PtaTCH2* transcripts after stem bending. Total RNAs were extracted from the stems of control plants (C) and from bent stems at different times (5, 10, 30 and 60 min). Changes in the abundance of *PtaZFP2*, *PtaACS* and *PtaTCH2* mRNAs were analyzed by RT-PCR using specific primers. As a control, the expression of *EF-1α* gene is also shown.

PtaTCH2 transcripts highly accumulated 10–30 min after bending as we observed for *PtaZFP2* but remained at the same level 1 h later (Figure 3). In contrast, no similar trend was detected for the *PtaEF-1 α* mRNA level.

To study the *PtaZFP2* expression in several poplar organs after local stem bending, we examined changes in the abundance of *PtaZFP2* transcripts by Northern blot analysis (Figure 4A). As shown in Figure 4B, *PtaZFP2* mRNAs were strongly accumulated in bent internodes and slightly in the roots. However, *PtaZFP2* transcripts were not detected in basal and apical leaves, apical

internodes, and apex. These results show that bending induced a rapid but transient accumulation of *PtaZFP2* transcripts, which is only localized in the stressed part of the plants.

Time course accumulation of *PtaZFP2* transcripts in response to gravitational stimulation

According to the recent hypotheses, internal and external mechanical signals are produced during plant responses to gravity (for review, see Telewski 2006). To study the time course accumulation of *PtaZFP2* transcripts during gravitational response, young poplars were inclined at 35° from the vertical axis. The real-time quantitative RT-PCR analysis showed that *PtaZFP2* mRNAs increased as soon as 10 min and accumulated 26-fold in the basal part of poplar stems 20 min after inclination (Figure 5A). *PtaZFP2* mRNA abundance remained high at 30 min and suddenly decreased at 45 min after the treatment, indicating again a rapid regulation of *PtaZFP2* and a transient accumulation of the transcripts during gravitational response. In comparison, the relative transcript abundance of *PtaZFP2* is 25-fold lower 30 min after gravitropic stimulus than that observed half an hour after a single stem bending (Figure 5B).

Expression pattern of *PtaZFP2* in response to other abiotic factors

To examine whether *PtaZFP2* was involved in other abiotic stresses, we investigated its expression under several stresses by the real-time quantitative RT-PCR analysis.

As shown in Figure 6, the treatment of poplars with NaCl by adding salt in hydroponic solution to 200 mM resulted in a slight but significant induction in roots. This 4-fold induction remained the same at 30 and 75 min after treatment. In basal leaves and internodes, a rapid and significant induction of *PtaZFP2* expression of 9- and 35-fold, respectively, was observed 30 min after treatment. Then, the abundance of *PtaZFP2* transcripts slowly decreased 75 min after treatment in these two types of organs but remained 10- and 4-fold higher than that in control plants. In apex, the accumulation of *PtaZFP2* transcripts was not detectable 30 min after treatment but a 70-fold relative abundance of transcripts was observed 75 min later. However, this induction by salt treatment remained 10- to 100-fold lower than that in bent plants (Figure 5B). Physiologically, 75 min after salt treatment, poplars carried out sloping leaves and wilt apex, showing that salt stress has been perceived by plants (data not shown).

Incubation of plants at 4 °C for 1 h induced an 85-fold induction of *PtaZFP2* expression in poplar stems (Figure 7A). After wounding, a 900-fold relative abundance of transcripts was observed in detached leaves 1 h after slashing (Figure 7B). On the contrary, no significant changes in mRNA levels could be observed in stems after the incubation of poplars in the dark for 1 h (Figure 7C).

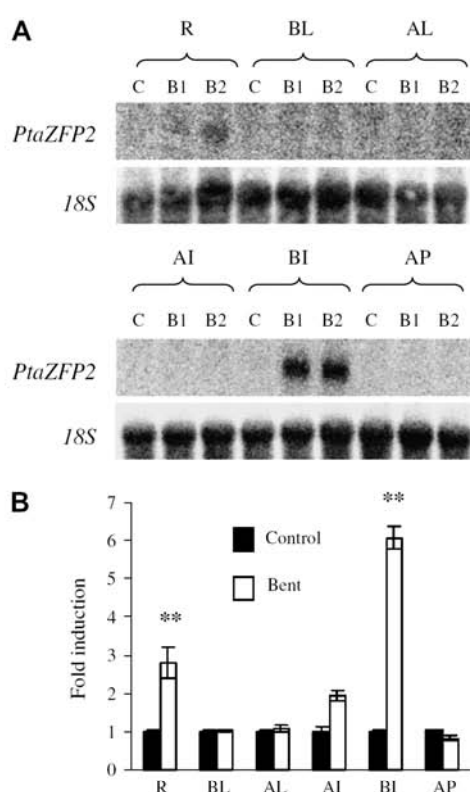


Figure 4. Northern blot analysis of the induction of the accumulation of *PtaZFP2* transcripts 1 h after basal internodes bending in several poplar organs. (A) Total RNAs were extracted from roots (R), basal leaves (BL) localized 2 cm above the bent part of the stem, apical leaves (AL) below the apex, apical internodes (AI) localized 1 cm below the apex, basal internodes (BI) located 10 cm above the collar and apex (AP) of control (C) and bent (B1, B2) plants. Total RNAs (15 µg) were separated on formaldehyde gel, blotted and probed with ³²P-labeled *PtaZFP2* gene-specific probe. The expression of 18S rRNA was used as a loading and transfer control and is shown below the specific gene. (B) The amount of *PtaZFP2* transcripts was obtained by quantifying each band. Quantifications were corrected by 18S rRNA and expressed as a relative value of control plants. Double asterisks (**) represent Student's *t* test significant at *P* < 0.01.

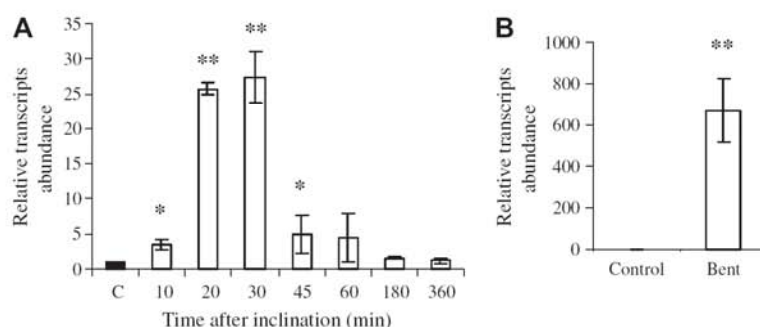


Figure 5. Time course accumulation of *PtaZFP2* after gravitational stimulus. (A) Total RNAs were extracted from the bottom part of the stems (2 cm above the collar) of control plants (C) and at 10, 20, 30, 45, 60, 180 and 360 min after plant inclination at 35°. (B) Total RNAs were extracted from control plant stems or from bent plant stems 30 min after bending. The accumulation of relative transcripts was determined by the real-time quantitative PCR and it corresponds to the mean values of three independent experiments. Asterisks (*) represent Student's *t* test significant at $P < 0.05$. Double asterisks (**) represent Student's *t* test significant at $P < 0.01$.

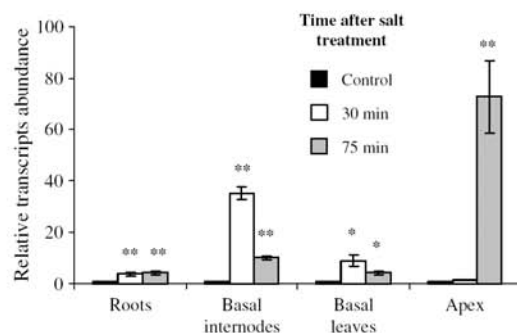


Figure 6. Abundance of relative transcripts of *PtaZFP2* after salt stress. Two-month-old poplars were transferred on nutrient solution or on nutrient solution with 200 mM NaCl. Total RNAs were extracted from roots, basal internodes (localized 10 cm above the collar), basal leaves (localized 2 cm above the basal internodes), and apex of control plants and plants treated with 200 mM NaCl for 30 or 75 min. The abundance of relative transcript was determined by the real-time quantitative RT-PCR and it corresponds to the mean values of three independent experiments. Asterisks (*) represent Student's *t* test significant at $P < 0.05$. Double asterisks (**) represent Student's *t* test significant at $P < 0.01$.

Discussion

The C2H2 ZFPs constitute one of the largest transcription factor families in plants (Takatsuji 1999, Englbrecht et al. 2004). In the database of *P. trichocarpa* transcription factors, the C2H2 transcription family contains more than 80 gene models (Zhu et al. 2007). In poplar, such proteins have not yet been functionally characterized. In this study, we identified one member of the C2H2 family in *P. tremula* × *P. alba*. This protein contains the plant-specific QALGGH motif in both ZF domains. According to the systematic classification of C2H2 proteins based on their ZF types proposed in

Arabidopsis (Englbrecht et al. 2004), *PtaZFP2* can be classified under family C1, earlier described as the EPF-family in *Petunia*. The detailed comparisons of the amino acid around the QALGGH motif suggest that *PtaZFP2* shows highest homology with C1-2iA (At2g37430, ZAT11) and C1-2iB (At3g46070, ZAT7 and At5g59820, ZAT12) sub-classes in *Arabidopsis*.

In *Petunia*, the QALGGH motif has already been demonstrated to be a sequence-specific DNA-binding domain (Takatsuji et al. 1994, Takatsuji and Matsumoto 1996, Yoshioka et al. 2001). Apart from QALGGH motifs, the B-box, the L-box and the DLN-box are partially conserved in *PtaZFP2*. The conserved L/F DLN L/F(X) P motif (DLN-box) found in several C2H2 proteins and ERF proteins can confer the capacity for repression on a heterologous DNA-binding domain and the motif itself is essential for such repression (Ohta et al. 2001). As in *Arabidopsis* ZAT12 protein, this motif is not completely conserved in *PtaZFP2* (LDLSLALP). Recently, the LxLxL motif found within domain I of Aux/IAA proteins was shown to be important to confer repression of auxin response genes via ARF-Aux/IAA dimerization on auxin-responsive promoters (Tiwari et al. 2004). Taken together, these structural features are consistent with *PtaZFP2* being an active repressor but experimental validation is required.

In this work, we showed that *PtaZFP2* is up-regulated by mechanical stress, wounding, and cold and salt treatments. These results are in line with the bioinformatic analysis of the regulatory region of *PtaZFP2*, revealing numerous putative cis-elements implicated in response to abiotic stresses. It is also consistent with the reported role of other C2H2-type ZFPs in regulating the defence response of plants to biotic and abiotic stress conditions (Sakamoto et al. 2004, Ciftci-Yilmaz and Mittler 2008). In particular, in *Arabidopsis*, *ZAT11* was shown to be highly induced by wounding (Cheong et al. 2002) and *ZAT12* is involved in light, cold and oxidative stresses (Rizhsky et al. 2004,

PtaZFP2 REGULATION OF EXPRESSION

133

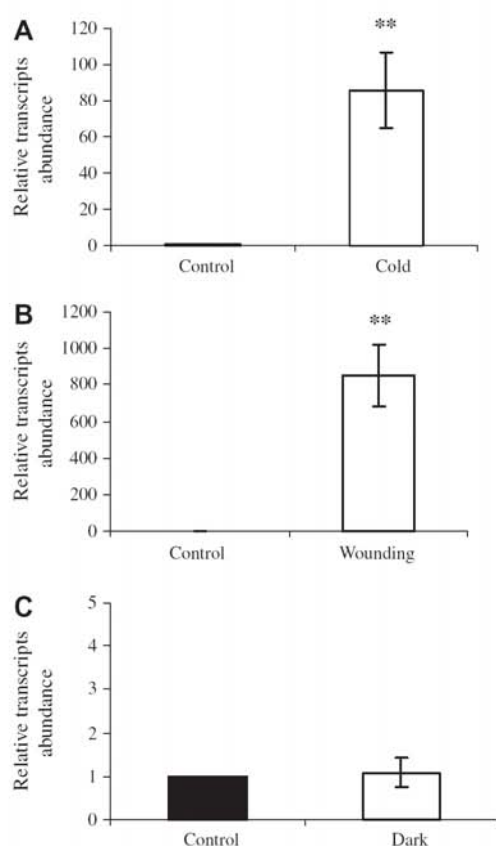


Figure 7. Abundance of relative transcripts of *PtaZFP2* under various abiotic factors. Two-month-old poplars were incubated at 4 °C (cold) (A) or in the dark (C) for 1 h, or their leaves were slashed (B) and collected 1 h later. Total RNAs were extracted from stems (A) and (C) or leaves (B) of control and stressed plants. Relative transcript abundance was determined by the real-time quantitative RT-PCR and corresponds to the means of three independent experiments. Double asterisks (**) represent Student's *t* test significant at $P < 0.01$.

Vogel et al. 2005, Davletova et al. 2005). *ZAT12* belongs to the 15 genes that are most inducible by touch, and it is also induced by darkness (Lee et al. 2005). Under our conditions, the accumulation of *PtaZFP2* transcripts is higher after wounding and bending stress than after cold and salt treatments.

Whereas many efforts were made recently to understand the function of the C2H2-type ZFPs in plant tolerance to light, drought, cold and high-salinity stress conditions, the regulation of this gene family by mechanical stimulus is not well understood. In our conditions, increase of *PtaZFP2* transcripts after bending is as rapid as the increase observed for other primary mechanical-response genes, such as *TOUCH* genes (Figure 3; Braam and Davis 1990) or *ACC synthase* (Figure 3; Botella et al. 1995), implying this gene is involved in the first stages of

mechanosensing in plants. These results are confirmed by the fact that the accumulation of *PtaZFP2* transcripts is detected only where the stress was applied after bending and as if it was following a gradient of dehydration along the stem caused by salt treatment. Our work suggested the involvement of *PtaZFP2* also in plant response to gravity applied on poplar stems with similar kinetics. This result is in favour of a unique mechanosensory network in plants perceiving the numerous mechanical signals of the environment (gravitropism, thigmomorphogenesis, self-loading, turgor pressure, and so on) as suggested by Telewski (2006). Recently, a C2H2-type *Arabidopsis* protein (SGR5), belonging to a distinct family (named as set A) that contains four ZFs without the QALGGH motif, has been involved in gravity perception after amyloplast sedimentation (Morita et al. 2006). As suggested by Ciftci-Yilmaz and Mittler (2008), it could be interesting to test if a cascade of ZFPs could be activated in response to various stresses. For example, during oxidative stress, *ZAT12* is required for the accumulation of *ZAT7* transcripts (Rizhsky et al. 2004).

No consensus for regulatory cis-elements for mechanical response has been clearly defined. Iliev et al. (2002) had described the regulatory region of *TCH4*, a gene encoding a xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XET), and up-regulated by touch stimulus in *Arabidopsis*. In their study, they demonstrated that the induction of *TCH4* by mechanical stimulus can be conferred by a 102 bp 5'-untranscribed region to a reporter gene. The same 102 bp is also sufficient for the induction of *TCH4* by other factors such as darkness, and heat and cold shocks. The authors described that this region contains an E-box/Mybore. Such elements are also found in the *PtaZFP2* regulatory region at positions -218 and -405 bp before the ATG codon. This consensus DNA sequence has also been described to correspond to the binding site of MYC2, a transcription factor involved in numerous abiotic stresses in other species. Apart from this box, no other similarities between the *TCH4* 102 bp regulatory region and *PtaZFP2* promoter sequence are found. However, in *Arabidopsis*, in the 1 kb context of the *TCH4* upstream region, this 102 bp motif is not necessary for the regulated expression, suggesting an involvement of other additional E-boxes and MYC motifs found in the distal regions.

Calcium and reactive oxygen species (ROS) function as versatile messengers in mediating the mechanical responses. Even though no known DNA-binding site for ROS responses was identified, two cis-elements that are involved in calcium response are found in the *PtaZFP2* promoter. *TCH2*, *TCH3* and *TCH4* promoter regions also contain one or two of these elements in sense or antisense orientation inside the 300 bp immediately upstream of the ATG codon but the *TCH1* promoter does not (TAIR database). Braam (1992) had demonstrated that all *TOUCH* genes except *TCH1* are regulated by calcium in cultured *Arabidopsis* cells. These three *TOUCH* genes were also identified in a transcriptomic approach studying genes responsive to cytosolic Ca^{2+}

transients in *Arabidopsis* (Kaplan et al. 2006) and the *Arabidopsis* C₂H₂-type ZFP ZAT10. Functional analysis of the deleted parts of the *PtaZFP2* promoter will help to define if such Ca²⁺ putative cis-element is involved in the up-regulation of the *PtaZFP2* by mechanical solicitation.

Recently, a global analysis studying the common aspects of abiotic stress responses demonstrated that at an early point, nine genes were up-regulated during all stress responses in *Arabidopsis* (Kilian et al. 2007). Among these genes, two C₂H₂ zinc finger transcription factors were described. The authors proposed that these nine early genes might represent basic but nonspecific master regulators and the stress-specific reactions would take place later (1–3 h after the stress). However, as observed by Kilian et al. (2007), according to the applied stress, differential kinetic expression of these genes will be observed suggesting a plant-specific response. As noticed by Telewski (2006), a number of these abiotic stimuli like cold, drought, or osmotic stress induce deformation via turgor pressure variation. Thus, they can also be considered as mechanical stimuli similar to wind and gravity. To elucidate the first stages of mechanoperception in plants, we are currently using *PtaZFP2* promoter-GFP fusions to study the *PtaZFP2* promoter regulation in transgenic poplars.

Acknowledgments

This research was funded by the commissariat Massif Central, a BQR research program of Blaise Pascal University and by a Ministry of Research grant (to Ludovic Martin). The authors are grateful to Dr. D. Biron for useful comments on the manuscript. The authors also thank Dr. J.S. Venisse for helpful advice on the real-time quantitative RT-PCR experiments.

References

- Abe, H., K. Yamaguchi-Shinozaki, T. Urao, T. Iwasaki, D. Hosokawa and K. Shinozaki. 1997. Role of *Arabidopsis* MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell* 9:1859–1868.
- Agarwal, P., R. Arora, S. Ray, A.K. Singh, V.P. Singh, H. Takatsuji, S. Kapoor and A.K. Tyagi. 2007. Genome-wide identification of C₂H₂ zinc-finger gene family in rice and their phylogeny and expression analysis. *Plant Mol. Biol.* 65:467–485.
- Almeras, T., E. Costes and J.C. Salles. 2004. Identification of biomechanical factors involved in stem shape variability between apricot tree varieties. *Ann. Bot.* 93:455–468.
- Anten, N.P.R., R. Casado-Garcia and H. Nagashima. 2005. Effects of mechanical stress and plant density on mechanical characteristics, growth, and lifetime reproduction of tobacco plants. *Am. Nat.* 166:650–660.
- Apel, K. and H. Hirt. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 55:373–399.
- Arteca, J.M. and R.N. Arteca. 1999. A multi-responsive gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase (ACS6) in mature *Arabidopsis* leaves. *Plant Mol. Biol.* 39:209–219.
- Baker, S.S., K.S. Wilhelm and M.F. Thomashow. 1994. The 5'-region of *Arabidopsis thaliana* cor15a has cis-acting elements that confer cold-regulated, drought-regulated and aba-regulated gene-expression. *Plant Mol. Biol.* 24:701–713.
- Biro, L.R. and M.J. Jaffe. 1984. Thigmomorphogenesis: ethylene evolution and its role in the changes observed in mechanically perturbed bean plants. *Physiol. Plant* 62:289–296.
- Botella, J.R., R.N. Arteca and J.A. Frangos. 1995. A mechanical strain-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:1595–1598.
- Boyer, N. 1967. Modification de la croissance de la tige de bryone (*Bryonia dioica*) à la suite d'irritations tactiles. *CRAS Paris* 267:2114–2117.
- Boyer, N., M.O. Desbiez, M. Hofinger and T. Gaspar. 1983. Effect of lithium on thigmomorphogenesis in *Bryonia dioica*. ethylene production and sensitivity. *Plant Physiol.* 72:522–525.
- Boyer, N., G. Dejaegher, M.C. Bon and T. Gaspar. 1986. Cobalt inhibition of thigmomorphogenesis in *Bryonia dioica* – possible role and mechanism of ethylene production. *Physiol. Plant* 67:552–556.
- Braam, J. 1992. Regulated expression of the calmodulin-related genes in cultured *Arabidopsis* cells – induction by calcium and heat-shock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3213–3216.
- Braam, J. 2005. In touch: plant responses to mechanical stimuli. *New Phytol.* 165:373–389.
- Braam, J. and R.W. Davis. 1990. Rain-, wind-, and touch-induced expression of calmodulin and calmodulin-related genes in *Arabidopsis*. *Cell* 60:357–364.
- Buchel, A.S., F.T. Brederode, J.F. Bol and H.J.M. Linthorst. 1999. Mutation of GT-1 binding sites in the Pr-1A promoter influences the level of inducible gene expression in vivo. *Plant Mol. Biol.* 40:387–396.
- Chang, S.J., J. Puryear and J. Cairney. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11:113–116.
- Cheong, Y.H., H.S. Chang, R. Gupta, X. Wang, T. Zhu and S. Luan. 2002. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 129:661–677.
- Chinnusamy, V., M. Ohta, S. Kanrar, B.H. Lee, X.H. Hong, M. Agarwal and J.K. Zhu. 2003. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 17:1043–1054.
- Chotikacharoensuk, T., R.N. Arteca and J.M. Arteca. 2006. Use of differential display for the identification of touch-induced genes from an ethylene-insensitive *Arabidopsis* mutant and partial characterization of these genes. *J. Plant Physiol.* 163:1305–1320.
- Ciftci-Yilmaz, S. and R. Mittler. 2008. The zinc finger network of plants. *Cell Mol. Life Sci.* 65:1150–1160.
- Coutand, C., M. Fournier and B. Moulia. 2007. The gravitropic response of poplar trunks: key roles of prestressed wood regulation and the relative kinetics of cambial growth versus wood maturation. *Plant Physiol.* 144:1166–1180.
- Coutand, C., C. Dupraz, G. Jaouen, S. Ploquin and B. Adam. 2008. Mechanical stimuli regulate the allocation of biomass in trees: demonstration with young *Prunus avium* trees. *Ann. Bot.* 101:1421–1432.
- Crook, M.J. and A.R. Ennos. 1996. Mechanical differences between free-standing and supported wheat plants, *Triticum aestivum* L. *Ann. Bot.* 77:197–202.
- Davletova, S., K. Schlauch, J. Coutu and R. Mittler. 2005. The zinc-finger protein Zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 139:847–856.

- Depege, N., C. Thonat, C. Coutand, J.L. Julien and N. Boyer. 1997. Morphological responses and molecular modifications in tomato plants after mechanical stimulation. *Plant Cell Physiol.* 38:1127–1134.
- Depege, N., J. Drevet and N. Boyer. 1998. Molecular cloning and characterization of tomato cDNAs encoding glutathione peroxidase-like proteins. *Eur. J. Biochem.* 253:445–451.
- Englbrecht, C.C., H. Schoof and S. Böhm. 2004. Conservation, diversification and expansion of C2H2 zinc finger proteins in the *Arabidopsis thaliana* genome. *BMC Genomics* 5.
- Erner, Y. and M.J. Jaffe. 1982. Thigmomorphogenesis – the involvement of auxin and abscisic-acid in growth-retardation due to mechanical perturbation. *Plant Cell Physiol.* 23: 935–941.
- Fujita, M., Y. Fujita, Y. Noutoshi, F. Takahashi, Y. Narusaka, K. Yamaguchi-Shinozaki and K. Shinozaki. 2006. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9:436–442.
- Gamsjaeger, R., C.K. Liew, F.E. Loughlin, M. Crossley and J.P. Mackay. 2007. Sticky fingers: zinc-fingers as protein-recognition motifs. *Trends Biochem. Sci.* 32:63–70.
- Henry, H.A.L. and S.C. Thomas. 2002. Interactive effects of lateral shade and wind on stem allometry, biomass allocation, and mechanical stability in *Abutilon theophrasti* (Malvaceae). *Am. J. Bot.* 89:1609–1615.
- Higo, K., Y. Ugawa, M. Iwamoto and T. Korenaga. 1999. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res.* 27:297–300.
- Iliev, E.A., W. Xu, D.H. Polisensky, M.H. Oh, R.S. Torisky, S.D. Clouse and J. Braam. 2002. Transcriptional and post-transcriptional regulation of *Arabidopsis* TCH4 expression by diverse stimuli. Roles of cis regions and brassinosteroids. *Plant Physiol.* 130:770–783.
- Jacobsen, J.V., F. Gubler and P.M. Chandler. 1995. Gibberellin action in germinated cereal grains. In *Plant Hormones*. Ed. P.J. Davies. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 246–271.
- Jaffe, M.J. 1973. Thigmomorphogenesis. The response of plant growth and development to mechanical stimulation. *Planta* 114:143–157.
- Jaffe, M.J. and S. Forbes. 1993. Thigmomorphogenesis – the effect of mechanical perturbation on plants. *Plant Growth Regul.* 12:313–324.
- Johnson, K.A., M.L. Sistrunk, D.H. Polisensky and J. Braam. 1998. *Arabidopsis thaliana* responses to mechanical stimulation do not require ETR1 or EIN2. *Plant Physiol.* 116:643–649.
- Kaplan, B., O. Davydov, H. Knight, Y. Galon, M.R. Knight, R. Fluhr and H. Fromm. 2006. Rapid transcriptome changes induced by cytosolic Ca^{2+} transients reveal ABRE-related sequences as Ca^{2+} -responsive cis elements in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18:2733–2748.
- Kilian, J., D. Whitehead, J. Horak, D. Wanke, S. Weinl, O. Batic, C. D'Angelo, E. Bornberg-Bauer, J. Kudla and K. Harter. 2007. The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *Plant J.* 50:347–363.
- Kim, S.Y., H.J. Chung and T.L. Thomas. 1997. Isolation of a novel class of bZIP transcription factors that interact with ABA-responsive and embryo-specification elements in the Dc3 promoter using a modified yeast one-hybrid system. *Plant J.* 11:1237–1251.
- Knight, M.R., S.M. Smith and A.J. Trewavas. 1992. Wind-induced plant motion immediately increases cytosolic calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4967–4971.
- Kubo, K., A. Sakamoto, A. Kobayashi, Z. Rybka, Y. Kanno, H. Nakagawa, T. Nishino and H. Takatsuji. 1998. Cys(2)/His(2) zinc-finger protein family of *Petunia*: evolution and general mechanism of target-sequence recognition. *Nucleic Acids Res.* 26:608–615.
- Leblanc-Fournier, N., C. Coutand, J. Crouzet, N. Brunel, C. Lenne, B. Moullia and J.L. Julien. 2008. JZFP2, encoding a Cys2/His2-type transcription factor, is involved in the early stages of the mechano-perception pathway and specifically expressed in mechanically stimulated tissues in woody plants. *Plant Cell Environ.* 31:715–726.
- Lee, D., D.H. Polisensky and J. Braam. 2005. Genome-wide identification of touch- and darkness-regulated *Arabidopsis* genes: a focus on calmodulin-like and XTH genes. *New Phytol.* 165:429–444.
- Matarasso, N., S. Schuster and A. Avni. 2005. A novel plant cysteine protease has a dual function as a regulator of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expression. *Plant Cell* 17:1205–1216.
- McMaugh, S.J. and B.R. Lyon. 2003. Real-time quantitative RT-PCR assay of gene expression in plant roots during fungal pathogenesis. *Biotechniques* 34:982.
- Meissner, R. and A.J. Michael. 1997. Isolation and characterisation of a diverse family of *Arabidopsis* two and three-fingered C2H2 zinc finger protein genes and cDNAs. *Plant Mol. Biol.* 33:615–624.
- Mitchell, C.A. 1996. Recent advances in plant response to mechanical stress: theory and application. *Hortscience* 31: 31–35.
- Montiel, G., P. Gantet, C. Jay-Allemand and C. Breton. 2004. Transcription factor networks. Pathways to the knowledge of root development. *Plant Physiol.* 136:3478–3485.
- Morita, M.T., K. Sakaguchi, S.I. Kiyose, K. Taira, T. Kato, M. Nakamura and M. Tasaka. 2006. A C2H2-type zinc finger protein, SGR5, is involved in early events of gravitropism in *Arabidopsis* inflorescence stems. *Plant J.* 47:619–628.
- Morizet, J. and M. Mingeau. 1976. Effect of environment on water-uptake, as studied on beheaded exuding tomato. I. role of nutrients. *Ann. Agron.* 27:183–205.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473–492.
- Nagano, Y. 2000. Several features of the GT-factor trihelix domain resemble those of the Myb DNA-binding domain. *Plant Physiol.* 124:491–493.
- Niklas, K.J. 1998. Effects of vibration on mechanical properties and biomass allocation pattern of *Capsella bursa-pastoris* (Cruciferae). *Ann. Bot.* 82:147–156.
- Nishiuchi, T., H. Shinshi and K. Suzuki. 2004. Rapid and transient activation of transcription of the ERF3 gene by wounding in tobacco leaves – possible involvement of NtWRKYs and autorepression. *J. Biol. Chem.* 279:55355–55361.
- Ohta, M., K. Matsui, K. Hiratsu, H. Shinshi and M. Ohme-Takagi. 2001. Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. *Plant Cell* 13:1959–1968.
- Pauw, B., F.A.O. Hilliou, V.S. Martin et al. 2004. Zinc finger proteins act as transcriptional repressors of alkaloid biosynthesis genes in *Catharanthus roseus*. *J. Biol. Chem.* 279:52940–52948.

- Potters, G., T.P. Pasternak, Y. Guisez, K.J. Palme and M.A.K. Jansen. 2007. Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends Plant Sci.* 12:98–105.
- Riechmann, J.L., J. Heard, G. Martin et al. 2000. *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 290:2105–2110.
- Rizhsky, L., S. Davletova, H.J. Liang and R. Mittler. 2004. The zinc finger protein Zat12 is required for cytosolic ascorbate peroxidase 1 expression during oxidative stress in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 279:11736–11743.
- Sakamoto, H., K. Maruyama, Y. Sakuma, T. Meshi, M. Iwabuchi, K. Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2004. *Arabidopsis* Cys2/His2-type zinc-finger proteins function as transcription repressors under drought-, cold-, and high-salinity stress conditions. *Plant Physiol.* 136:2734–2746.
- Simpson, S.D., K. Nakashima, Y. Narusaka, M. Seki, K. Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2003. Two different novel cis-acting elements of *erd1*, a *clpA* homologous *Arabidopsis* gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence. *Plant J.* 33:259–270.
- Takatsujii, H. 1998. Zinc-finger transcription factors in plants. *Cell. Mol. Life Sci.* 54:582–596.
- Takatsujii, H. 1999. Zinc-finger proteins: the classical zinc finger emerges in contemporary plant science. *Plant Mol. Biol.* 39:1073–1078.
- Takatsujii, H. and T. Matsumoto. 1996. Target sequence recognition by separate type Cys(2)/His(2) zinc finger proteins in plants. *J. Biol. Chem.* 271:23368–23373.
- Takatsujii, H., M. Mori, P.N. Benfey, L. Ren and N.H. Chua. 1992. Characterization of a zinc finger DNA-binding protein expressed specifically in *Petunia* petals and seedlings. *Embo J.* 11:241–249.
- Takatsujii, H., N. Nakamura and Y. Katsumoto. 1994. A new family of zinc-finger proteins in *Petunia* – structure, DNA-sequence recognition, and floral organ-specific expression. *Plant Cell* 6:947–958.
- Telewski, F.W. 2006. A unified hypothesis of mechanoperception in plants. *Am. J. Bot.* 93:1466–1476.
- Tiwari, S.B., G. Hagen and T.J. Guilfoyle. 2004. Aux/IAA proteins contain a potent transcriptional repression domain. *Plant Cell* 16:533–543.
- Ulker, B. and I.E. Somssich. 2004. WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 7:491–498.
- Vogel, J.T., D.G. Zarka, H.A. Van Buskirk, S.G. Fowler and M.F. Thomashow. 2005. Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of *Arabidopsis*. *Plant J.* 41:195–211.
- Washio, K. 2001. Identification of Dof proteins with implication in the gibberellin-regulated expression of a peptidase gene following the germination of rice grains. *Biochim. Biophys. Acta.* 1520:54–62.
- Yanagisawa, S. 2002. The Dof family of plant transcription factors. *Trends Plant Sci.* 7:555–560.
- Yang, T.B. and B.W. Poovaiah. 2002. A calmodulin-binding/CGCG box DNA-binding protein family involved in multiple signaling pathways in plants. *J. Biol. Chem.* 277:45049–45058.
- Yoshioka, K., S. Fukushima, T. Yamazaki, M. Yoshida and H. Takatsujii. 2001. The plant zinc finger protein ZPT2-2 has a unique mode of DNA interaction. *J. Biol. Chem.* 276:35802–35807.
- Ziegenhagen, B., P. Guillemaut and F. Scholz. 1993. A procedure for mini-preparations of genomic DNA from needles of silver fir (*Abies alba* Mill). *Plant Mol. Biol. Rep.* 11:117–121.
- Zhou, D.X. 1999. Regulatory mechanism of plant gene transcription by GT-elements and GT-factors. *Trends Plant Sci.* 4:210–214.
- Zhu, Q.H., A.Y. Guo, G. Gao, Y.F. Zhong, M. Xu, M.R. Huang and J.C. Luo. 2007. DPTF: a database of poplar transcription factors. *Bioinformatics* 23:1307–1308.

Chapitre 2

*Etude quantitative de l'effet
d'une flexion transitoire sur la
croissance en diamètre de
jeunes peupliers et sur
l'expression du gène *PtaZFP2**

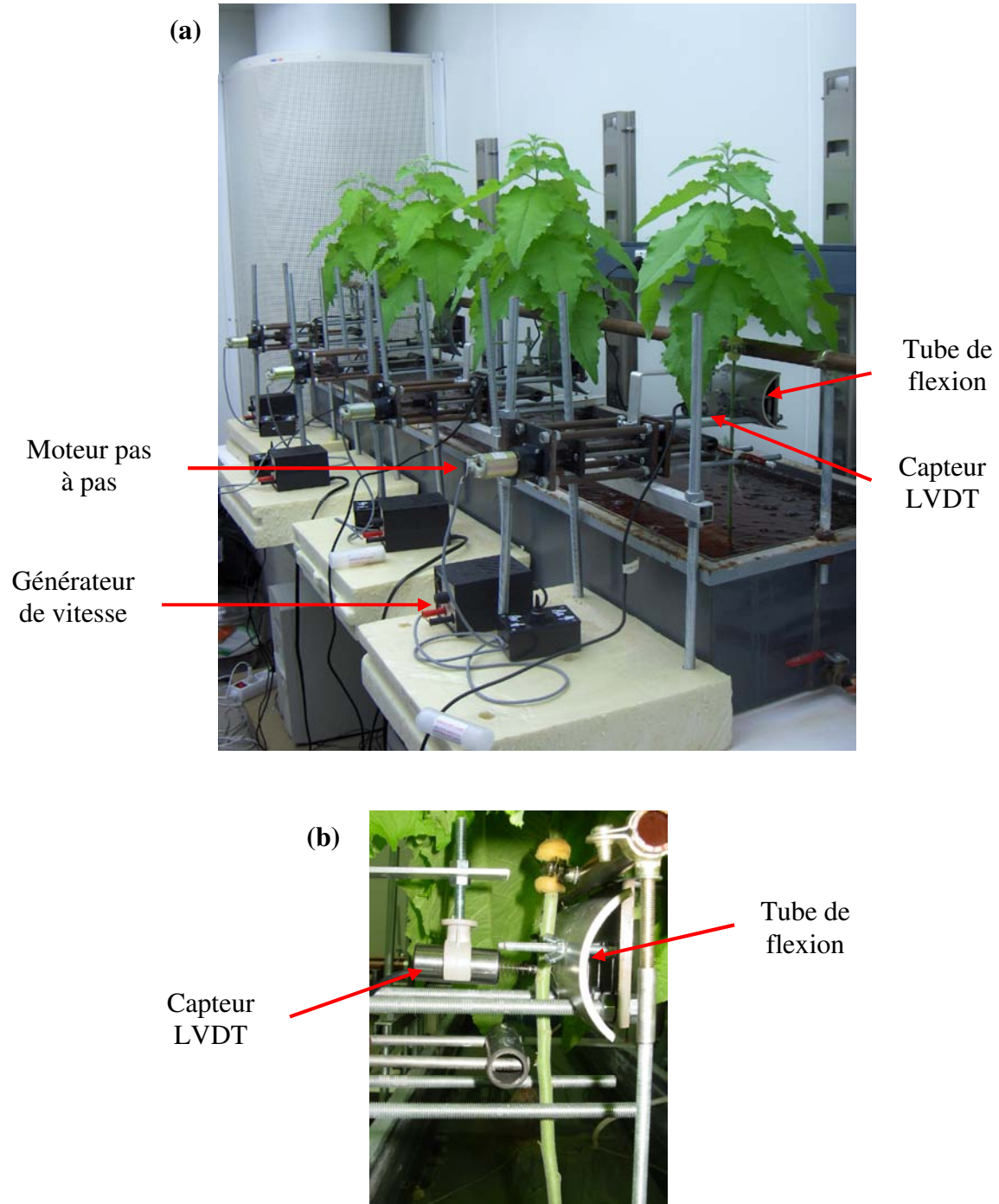


Figure 16 : Dispositif expérimental de flexion.

Les peupliers sont installés par quatre sur des cuves contenant 100 litres de solution nutritive (annexe 1). Lors de l'installation, le diamètre des plantes est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse. Lors de la flexion, une partie de la tige est enroulée autour d'un tube PVC à l'aide d'un bras mobile. Le diamètre du tube PVC est choisi en fonction de la courbure que l'on souhaite imposer. La détermination de ces deux paramètres (diamètre du tube PVC et diamètre de la tige) permet de quantifier la somme des déformations subies par la tige au cours de la flexion. Le bras mobile est relié à un moteur pas à pas lui-même connecté à un générateur de vitesse (a). Le dispositif permet de réaliser des flexions à une vitesse comprise entre 20 et 120 mm/min. Les mesures en continu de la croissance en diamètre sont réalisées à l'aide d'un capteur de déplacement LVDT (b).

Comme je l'ai évoqué dans la synthèse bibliographique, la capacité de pouvoir contrôler l'intensité du stimulus mécanique appliqué aux plantes est essentielle pour analyser la variabilité des réponses mises en jeu et donc comprendre la régulation de la mécanoperception. Chez la tomate, Coutand et Moulia (2000) ont montré que la variable mécanique perçue par les plantes est la déformation subie (ϵ) et non pas les contraintes (σ) ou la force appliquée. Ils ont proposé un modèle intégratif de la mécanoperception basé sur deux hypothèses : (i) chaque petit élément de tissu de la tige perçoit la déformation qu'il subit pour générer un signal dS dont l'intensité est proportionnelle à la déformation perçue, (ii) ces signaux se somment pour donner un signal S qui conduit à une réponse thigmomorphogénétique observable à l'échelle de la plante. Ce modèle de mécanoperception prédit donc une relation entre la somme des déformations longitudinales appliquées et l'intensité de la réponse de la plante. Cependant, le modèle a été obtenu à partir d'une étude de la réponse physiologique à distance de la zone sollicitée (Coutand et Moulia, 2000) et les hypothèses sous-jacentes à celui-ci n'avaient pas pu être testées. En effet, cela nécessitait de disposer d'une réponse locale. Enfin, ce modèle n'avait jamais été vérifié sur une autre plante.

Afin de valider les hypothèses du modèle de mécanoperception sur le peuplier, nous avons choisi d'étudier deux réponses locales : l'une macroscopique correspondant à la croissance en diamètre de la tige dans la zone sollicitée, et l'autre cellulaire en suivant le niveau d'expression du gène primaire mécanosensible *PtaZFP2*.

Cette étude, réalisée sur de jeunes peupliers cultivés en hydroponie, nécessitait un dispositif de flexion permettant de contrôler les déformations imposées. Dans le cas d'une flexion, la somme des déformations subie par la tige dépend du diamètre de la tige et de la courbure appliquée. Afin de réaliser cette courbure de manière contrôlée et reproductible, nous avons mis au point un système de flexion original qui permet de fléchir la partie basale de la tige au contact d'un tube en plastique de diamètre connu (figure 16). Le dispositif est équipé d'un moteur pas à pas, lui-même connecté à un générateur de vitesse qui permet de réaliser des flexions à une vitesse donnée. Grâce à ce système, nous avons eu la possibilité de faire varier l'intensité du stimulus mécanique (en modifiant le diamètre du tube PVC) et d'étudier la réponse des tiges dans une gamme de sommes de déformations connue. Cette étude nécessitait également une mesure fine de la croissance secondaire, le système de flexion comprend donc également un capteur de déplacement LVDT (Linear Voltage Differential Transducer) qui permet de mesurer la croissance en diamètre en continu.

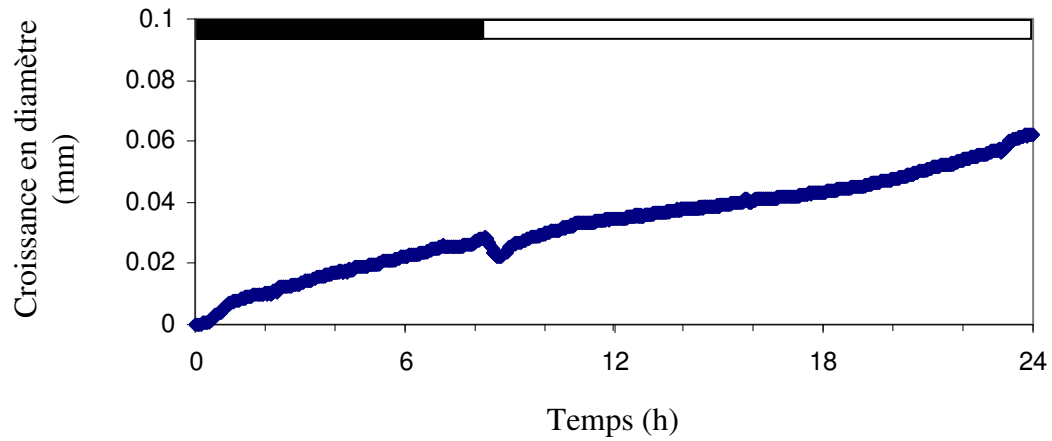


Figure 17 : Croissance en diamètre journalière d’une tige de peuplier avant réalisation de la flexion, mesurée à l’aide du LVDT présent dans le dispositif expérimental de flexion.

Cet enregistrement type est représentatif des résultats obtenus avec les plantes analysées. La croissance en diamètre est rythmique avec un ralentissement de la vitesse de croissance en milieu de journée. Les périodes d’obscurité et d’éclairement dans la chambre de culture sont figurées respectivement par les cadres noirs et blancs situés au-dessus de la courbe.

La croissance en diamètre en continu de jeunes peupliers cultivés en hydroponie n'ayant jamais été décrite, les premières expérimentations réalisées à l'aide du dispositif ont eu pour but de caractériser la croissance en diamètre journalière des plantes en absence de flexion. Comme le montre l'enregistrement type présenté en figure 17, la croissance en diamètre présente un rythme journalier. Dans nos conditions de culture, ce rythme de croissance peut être décomposé en 3 phases qui sont observées sur les enregistrements des différentes plantes étudiées. Afin de caractériser ce rythme, la vitesse de croissance a été calculée à 3 moments de la journée : la nuit (2h - 5h), le jour (12h - 17h) et la soirée (20h - 22h30). Les vitesses de croissance mesurées la nuit ($2,9 \pm 1,8 \mu\text{m/h}$) et en soirée ($3,1 \pm 1,4 \mu\text{m/h}$) sont environ 3 fois supérieures à celles obtenues en milieu de journée ($0,8 \pm 1,1 \mu\text{m/h}$). Ce ralentissement observé la journée va même, chez certaines plantes, jusqu'à un arrêt de leur croissance pendant cette phase. Dans la suite de nos expériences, connaissant ce rythme de croissance en diamètre, nous avons choisi d'appliquer les flexions à 17h, ce qui correspondait à une reprise de la croissance rapide.

Afin de tester la validité des hypothèses du modèle de mécanoperception, nous avons appliqué différentes sommes de déformations aux tiges de peuplier en faisant varier le diamètre du tube PVC du dispositif de flexion. Après avoir caractérisé l'effet d'une flexion transitoire sur la croissance en diamètre, nous avons analysé les corrélations entre les sommes de déformations longitudinales appliquées à la tige lors des flexions et les deux réponses locales : la croissance en diamètre et le niveau d'expression du gène *PtaZFP2*.

Ce deuxième chapitre fait l'objet d'une publication qui paraîtra en septembre 2009 dans le journal *Plant Physiology*.

Strain mechanosensing quantitatively controls diameter growth and *PtaZFP2* gene expression in poplar

Catherine Coutand^{2*}, Ludovic Martin^{1*}, Nathalie Leblanc-Fournier¹, Mélanie Decourteix¹, Jean-Louis Julien¹, Bruno Moulia²

¹ Université Blaise Pascal, UMR 547 PIAF, F-63000 Clermont-Ferrand, France

² INRA, UMR 547 PIAF, F-63100 Clermont-Ferrand, France

* The authors contributed equally to this work.

Running head: Mechanosensing in poplar

Corresponding author:

Catherine Coutand

UMR 547 PIAF, INRA, 234 avenue du Brézet, F-63100 Clermont-Ferrand

Tel: 00 33+ 4 73 62 46 73

E-mail: coutand@clermont.inra.fr

Journal research area: Environmental stress and adaptation

Footnotes:

Financial source: This work was funded by the Department “Environment and Agronomy” of INRA as the innovating project PSI-EA-3729B.

Abstract

Mechanical signals are important factors that control plant growth and development. External mechanical loadings lead to a decrease in elongation and a stimulation of diameter growth, a syndrome known as thigmomorphogenesis. A previous study has demonstrated that plants perceive the strains they are subjected to and not forces or stresses. On this basis, an integrative bio-mechanical model of mechanosensing was established (“sum-of-strains model”), and tested on tomato elongation but not for local responses such as diameter growth or gene expression. The first aim of this interdisciplinary work was to provide a quantitative study of the effect of a single transitory bending on poplar diameter growth and on the expression level of a primary mechanosensitive transcription factor gene, *PtaZFP2*. The second aim of this work was to assess the sum-of-strains model of mechanosensing on these local responses. An original bending device was built to study stem responses according to a controlled range of strains. A single bending modified plant diameter growth and increased the relative abundance of *PtaZFP2* transcripts. Integrals of longitudinal strains induced by bending on the responding tissues were highly correlated to local plant responses. The “sum-of-strains” model of mechanosensing established for stem elongation was thus applicable for local responses at two scales: diameter growth and gene expression. These novel results open avenue for the ordering of gene expression profiles as a function of the intensity of mechanical stimulation and provide a generic bio-mechanical core for an integrative model of thigmomorphogenesis linking gene expression with growth responses.

Keywords: mechanosensing, diameter growth, poplar, C2H2 zinc finger putative transcription factor, bending, biomechanics.

Attention is currently being refocused on mechanical signals as major cues that control plant growth and development, and thereby the acclimation of plants to their mechanical environment (e.g., Moulia et al., 2006, Hamant et al., 2008). The modification of growth by external mechanical loading is known as thigmomorphogenesis. The thigmomorphogenetical syndrome was reported by Boyer (1967) and Jaffe (1973) and has been subsequently described at the whole plant level in herbaceous (Latimer et al., 1986; Biddington and Dearman, 1987; see Biddington, 1985 for a review) as well as in woody plants (Telewski and Pruyn, 1998; Coutand et al., 2008). In plant stems, this syndrome generally combines a reduction of elongation and a stimulation of diameter growth, in comparison with unstimulated plants (Telewski and Pruyn, 1998; Coutand et al., 2008), and involves local as well as long-distance signaling (Coutand et al., 2000). This syndrome is believed to be involved in the acclimation of the architecture of the plant to its chronic wind environment (Rodriguez et al., 2008). As a corollary, the reduction of mechanical loading (tether staking, individual shelter) induces a reduction of diameter growth to the benefit of growth in height (Jacobs, 1954; Larson, 1965; Meng et al., 2006; Coutand et al., 2008).

However, quantitative data about mechanosensing are lacking (Telewski, 2006). Most thigmomorphogenesis studies use different types of mechanical solicitations and the mechanical loadings applied to the plants are generally uncontrolled. Comparisons between these experiments are thus difficult and no quantitative relationship can be assessed between the thigmomorphogenetical stimulus and the plant response (except Jaffe et al., 1980, Coutand and Moulia, 2000). Moreover, in most cases, the mechanical loading is applied every day for a few weeks, whereas the effect of these repetitive stimuli in terms of growth in height and/or diameter is often only assessed at the end of the experiment. Coutand et al. (2008) found no correlation between repetitive bending strains and *Prunus avium* responses, probably because trees acclimated when they were regularly loaded; so that their sensitivity to a given loading was dependant on the preceding loading (mechanical history). The study of the effect of a single mechanical loading thus appears to be a prerequisite for studying the effect of different loading frequencies. Nevertheless, such studies of the effect of a single mechanical stimulus on plant growth remain rare. Measuring the effect of a single loading on growth requires tools capable of measuring small amounts of growth (especially for diameter growth). The linear voltage differential transducer (LVDT) makes this possible (Daudet et al., 2005; Giovannelli et al., 2007). Using this device, Coutand et al. (2000) were able to characterize the kinetics of transient elongation cessation after a single stem bending. But to our knowledge, the effect of a single bending on diameter growth has never been documented.

Using a detailed biomechanical analysis of the effect of a single bending on stem elongation growth response on plants with varying tissue rigidities and sizes, Coutand and Moulia (2000) demonstrated that tissue strains (ϵ : relative length changes of each element) and not forces or stresses (σ : internal forces per unit area) are sensed (as was also found in animal cells; see Moulia et al. (2006) for a comparative review). On the basis of this fact, they proposed an integrative model of mechanosensing. This model was based on two assumptions: (i) each small volume of mechanosensitive tissue dV produces a secondary signal dS proportional to the strain of the small tissue element

$$dS = k \epsilon dV \quad (1)$$

(provided that the strains are small so that the primary responses of the mechanosensing pathway can be linearized), and (ii) these secondary elementary signals dS add up to a cumulated signal S over all the competent tissues involved in the mechanoperception

$$S = k \cdot \iiint_{\text{competent tissues}} \epsilon_{(x,y,z)} \cdot dx \cdot dy \cdot dz = k \cdot S_{\text{strains}} \quad (2)$$

The thigmomorphogenetical signal S then comes to be proportional to the sum of applied strains (S_{strains}), so that S_{strains} provides a quantitative model of the integrated mechanical stimulus on the plant tissues. Note that strain is a dimensionless variable (relative change in length of an infinitesimal element dV) but the sum of longitudinal strains is a volumic integral on the stem volume, and has thus unit of mm^3 (see Coutand and Moulia (2000) for more details). In Coutand and Moulia's study, as the mechanical stimulus was a bending in the range of small displacements and small strains, the longitudinal bending strains were the major strains component (the calculation of the sum of longitudinal strains is detailed in the MATERIALS AND METHODS section of the present publication.)

The strain-sensing hypothesis (1) and the "Sum-of-strains" integrative model for mechanoperception (2) have been shown to explain univocally the variation in primary growth for different applied loads and tissue rigidities. Indeed Coutand and Moulia found a close log dose-response curve between the duration of the primary growth inhibition response D and the sum of longitudinal strains, S_{strains}

$$D = a \cdot \ln(S_{\text{strains}}/S_{0\text{strains}}) \text{ for } S_{\text{strains}} \geq S_{0\text{strains}} \quad (3)$$

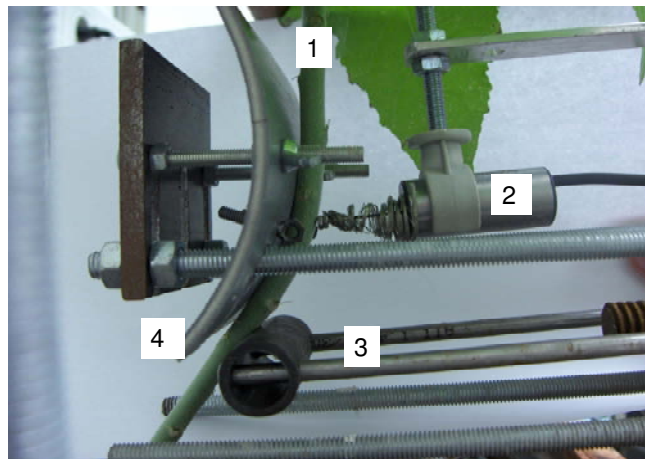
whereas no relation could be found with force, stresses or mechanical energy (Coutand et al. 2000, Coutand and Moulia 2000). Equation (3) means the inhibition of primary growth through systemic long-distance signaling depends loglinearly on the sum of strains over a threshold $S_{0\text{strains}}$ with a sensitivity equal to a .

The “sum-of-strains” mechanoperceptive model (equations 1 and 2) has been considered as a step forward for quantifying the local mechanical signal to cells (tissue strains) and integrating it into whole plant responses (Braam, 2005; Telewski, 2006; Moulia et al., 2006). Indeed equations (1) and (2) constitute more than a dose-response model as equation (1) also integrates the quantitative effect of the size and anatomy of the plant defining the “perceptive structure” of the plant (i.e., more mechano-competent cells at the same strain level produce more thigmomorphogenetical signal *S*, but more rigid tissues and organs are less strained for the same force, and hence sense less (Coutand and Moulia, 2000)). This model generalizes the first quantitative response curve obtained by Jaffe et al. (1980) in beans, where the mechanical stimulus was quantified in terms of force or “degree of bending” but not in terms of strains, and a loglinear relationship between the applied force and the stem elongation was found. Indeed the study of Jaffe et al. was using very standardized plants with consequently very similar rigidity, so that in this case the bending force is almost proportional to the sum of strains.

However, the assessment of the sum of strains model has been conducted on a global response, elongation growth. The underlying local assumptions of the “Sum-of- strains” mechanoperceptive model have not been directly assessed. This would require the analysis of two types of local responses: responses specific to a position along the stem, such as the diameter growth (Daudet et al., 2005), and cellular responses involved in the mechanosensing pathway, such as the expression of a primary mechanosensing marker gene. Indeed, equation (1) predicts that the closer the response to the primary reaction of the local mechanosensing pathway, the more linear the relationship between the response and the sum of strains in the strained sensing tissue (in the range of small strains).

At the cellular level, 760 genes were regulated 30 min after touching the rosette leaves in *Arabidopsis*. They represent 2.5% of the *Arabidopsis* genome (Lee et al., 2005) and include TOUCH genes first identified by Braam and Davis (1990). In woody plants, a primary mechanosensitive gene called *JrZFP2* has recently been found in walnut (Leblanc-Fournier et al., 2008). The homologue of this gene has also been found in poplar (*Populus tremula* × *alba* cv 717-1B4) and called *PtaZFP2* (Martin et al., 2009). The deduced amino acid sequence of *PtaZFP2* contains all typical conserved regions of Cys2/His2 transcription factors with two zinc fingers (Martin et al., 2009; Ciftci-Yilmaz and Mitler, 2008). In both walnut and poplar, transcripts levels of *ZFP2* are much higher after mechanical loading than after other abiotic factors such as saline or cold stresses (Leblanc-Fournier et al., 2008; Martin et al., 2009).

A



B

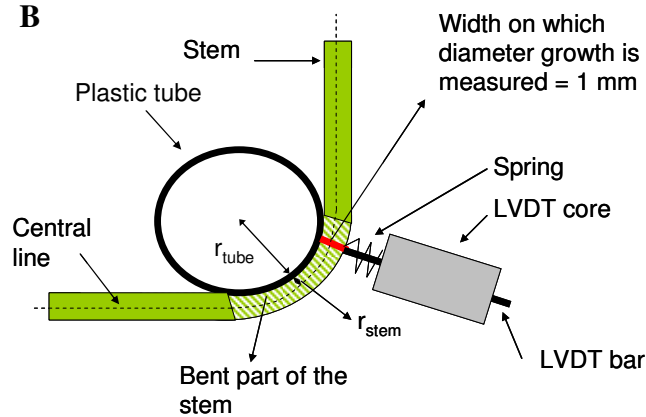


Figure 1. Bending device.

A, The stem (1) was equipped with a linear voltage displacement transducer (2) in order to monitor the diameter growth of the stem before, during and after bending was applied. A moving arm (3) pushed the stem against a plastic tube; the stem was thus bent around the tube (4). Therefore, the stem was subjected to a controlled curvature in terms of strains. The moving arm was then driven back and the stem was reset to its initial position.

B: Scheme of the stem in the bent state. Locally, the applied strain is the product of the curvature of the central line and the stem radius (r_{stem}). In the case of small curvature, the curvature of the central line is given by the inverse of the sum of the stem radius and of the radius of the plastic tube (r_{tube}).

Moreover, after stem bending, *ZFP2* is only expressed in the mechanically-strained tissues (Leblanc-Fournier et al., 2008; Martin et al., 2009). Finally, in poplar, this gene has been shown to be expressed as soon as 5 minutes after bending with a maximum level of expression 30 minutes later, and then decreasing one hour after bending. Since *PtaZFP2* is mechanosensitive and expresses (i) rapidly after mechanical loading is applied (i.e., during the perception-transduction phase), and (ii) only in the tissues undergoing mechanical strains, it is therefore an ideal candidate to test the biophysical model of mechanosensing at the cellular level.

In summary, this work hypothesized that the mechanosensing model initially established for tomato stem elongation also applied for local responses. This hypothesis was assessed by quantifying short-term local responses of plants to a single controlled mechanical loading and determining whether or not this mechanosensing model also applies quantitatively to two local responses occurring at two spatial scales: (i) modification of diameter growth at the macroscopic scale, along the stem and (ii) expression level of the mechanosensitive gene, *PtaZFP2*, at the cellular scale. Young poplar stems were submitted to a single transitory bending using an original experimental device (Fig. 1), allowing us to control the level of applied bending strains. The plant responses were studied according to a range of applied strains. The effective thigmomorphogenetical stimulus S was assumed to be proportional to the sum of longitudinal strains computed on the local responding zone. The plant responses (modification of diameter growth and expression level of *PtaZFP2*) were then plotted against the sums of longitudinal strains. The results demonstrated that the maximal diameter growth rate reached after bending, as well as the relative abundance of *PtaZFP2* mRNAs were linearly correlated to the integrals of longitudinal strains. The biomechanical model of perception developed for tomato stem elongation thus appeared to apply to diameter growth and even at the cellular level for a mechanosensitive gene. This provides a way to enhance the quantitative modeling of the macroscopic aspects of the thigmomorphogenetic syndrome and to establish a novel quantitative action law for the expression of a mechanosensitive primary gene over mechanically-strained tissues.

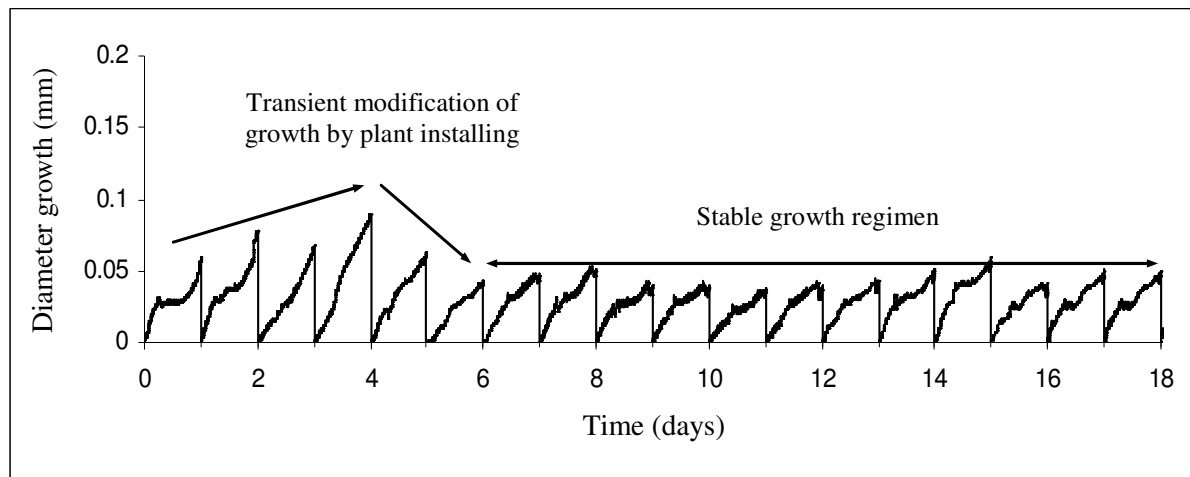


Figure 2. Representative example of diameter growth of a control plant.

The daily recorded diameter growth is plotted against time. Just after plant installation, the diameter growth rate exhibited an increase for 3 or 4 days, followed by a decrease, and finally reached a stable growth rate after 5 to 6 days. The daily growth appeared to be rhythmic, with higher growth rates during the dark period and at the end of the light period.

RESULTS

Tests of the experimental design

An original experimental device delivering a controlled and quantified level of longitudinal strains to the plants was designed (Fig. 1, see experimental procedures for more details). The basal part of the stem was curved homogeneously on a plastic tube which diameter is known. The longitudinal strain in the stem tissues is then dependent on the tube radius as well as on the stem radius. Taking the variability of stems diameters into account, plastic tubes of different diameters were used to create a range of applied strains. In order to study the response in terms of diameter growth, the experimental device also included a linear voltage differential transducer (LVDT) placed within the bent part of the stem and dedicated to monitor continuously the stem diameter growth before and after bending (Fig. 1A). Such a device records all diameter variations which mainly include diameter growth and elastic diameter variations due to changes of plant water status. Nevertheless in our hydroponic experiments with low evaporative demand the diameter variations attributed to changes in plant water status appeared very limited. Indeed there was no typical wavy signal characterizing stem diameter variations due to stem water status changes (Daudet et al., 2005) except a small reversible component in diameter observed at the transition between night and day periods also the time of temperature variations, and a transient visco-elastic effect of the mechanical compression during bending to be presented in the following. Apart from these transitions, the LVDT recording thus represents essentially stem diameter growth so its output has been called diameter growth in the following. If variations of growth rate are observed they are attributed to internal biological rhythm.

Since plant installation necessarily involves uncontrolled mechanical perturbations, we first assessed the time for the plant to recover an undisturbed state by following the growth after installing the plants on the bending device (without any subsequent mechanical treatment). Plant diameter growth rate increased for two or three days and then decreased and stabilized (Fig. 2). When stabilized, plants exhibited a rhythmic growth with higher growth rates in the dark period and at the end of the light period. For the tested stems, the average daily increment of diameter was 0.056 ± 0.031 mm. Controlled bending was applied after the plant diameter growth rate had stabilized (i.e., at least five days after plant installation) for all bending experiments so as to avoid uncontrolled effects of mechanical strain due to plant installation.

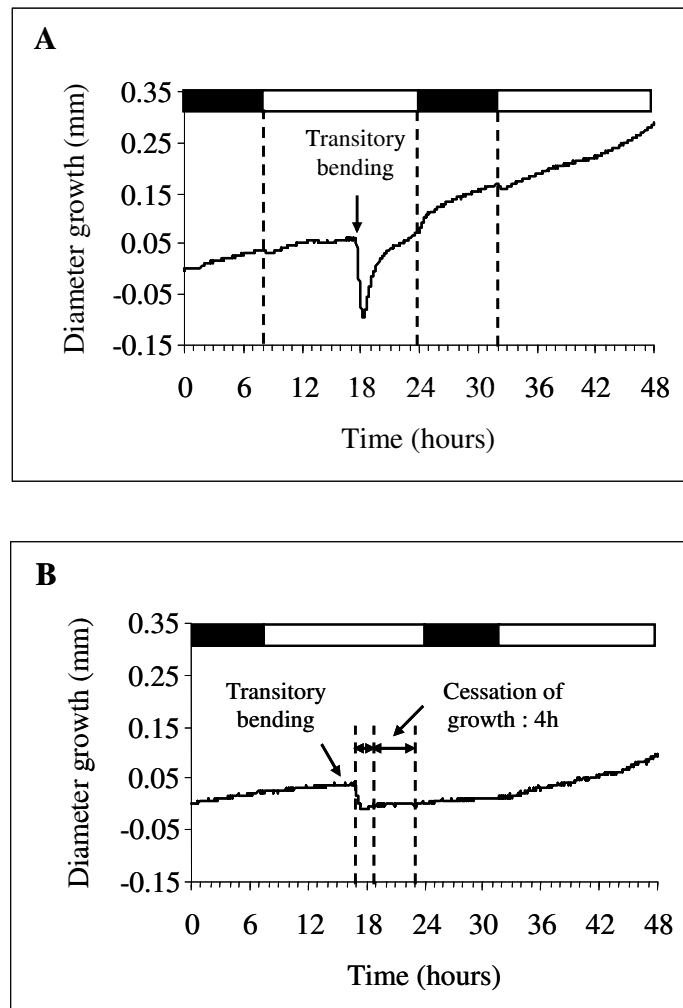


Figure 3. Representative examples of short-term diameter growth plant responses after a single transitory bending.

A, Representative example of a short-term monitoring of the LVDT signal after bending applied by curving the stem against a plastic tube. The diameter decreased just after bending and returned to its former pre-bending value within a few hours. The decrease of stem diameter was due to the compression of the stem against the tube during bending.

B, Representative example of the short-term monitoring of the LVDT signal after manually bending the plant without a plastic tube. Bending induced a slight decrease of the stem diameter, followed by a cessation of diameter growth for 4 h. Diameter growth then slowly began again for 6 h and subsequently reached values that were higher than those before bending was applied.

As shown on Figure 1A, pushing the plant stem against the plastic tube led to a homogeneous bending of the stem around the tube, which made it possible to assimilate the stem to a flexed beam and to therefore apply beam theory for flexural strains computation (Moullia and Fournier, 1997).

Since bending can affect growth within minutes (Coutand et al., 2000), we checked the growth recorded just after bending. When a single bending was applied, the LVDT signal decreased for one to two hours, suggesting a decrease of the stem diameter (Fig. 3A), and then progressively increased for several hours before it returned to the position it had before bending. This decrease of stem diameter just after bending was mainly attributed to the direct mechanical effect of the pressure exerted on the stem when the plant is pushed against the plastic tube during bending leading to a transient visco-elastic compression strain in the radial direction. Indeed, when plants were submitted to bending without the plastic tube (and thus to bending strain without radial compression), the phenomenon was largely reduced (Fig. 3B). Nevertheless, even without the plastic tube, bending induced a slight decrease of stem diameter which may reflect a variation of turgor pressure due to bending. After this slight decrease of stem diameter, the diameter growth stopped for 4 hours. A proxy of this compression strain against the tube was computed by dividing the initial variation of stem diameter by the stem diameter. The average value of the compression strain was $1.4 \pm 0.8\%$.

Effect of a single bending on plant diameter growth

A representative example of the effect of a single controlled bending on stem diameter growth is shown on Figure 4. Bending induced a long-lasting increase in the diameter growth rate. Diameter growth rate reached its maximal value the second (65% of the plants) or the third day (35% of the plants) after bending. The maximal diameter growth rate reached after bending was variable between stems, ranging from 0.09 to 0.22 mm.day⁻¹ with an average value of 0.16 ± 0.03 mm.day⁻¹. After this peak, the diameter growth rate regularly decreased and finally reverted to the values found before bending. The duration of the response was considered as the time between the application of bending and the time when diameter growth reverted back to the values observed before bending. Once the peak of diameter growth rate was reached, the time for the plant to recover a growth rate similar to the one before bending was highly variable and estimated between 2 to 11 days with an average value of 4.8 ± 2.7 days.

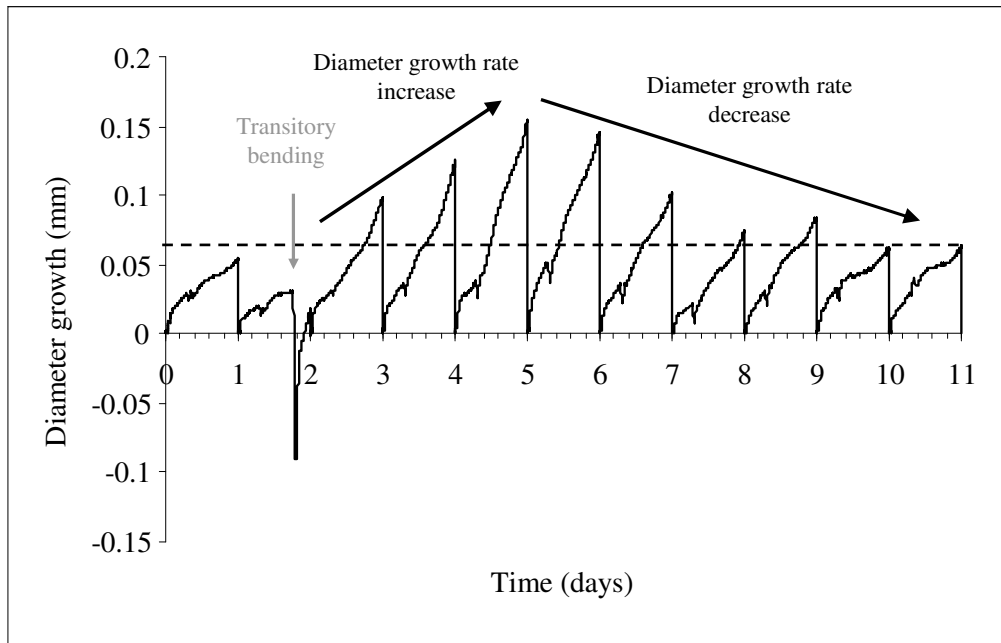


Figure 4. Representative example of the effect of a single transitory bending on stem diameter growth.

Before the application of a transitory bending, the diameter growth rate was stable. The application of a transitory bending (grey arrow) led to an increase in diameter growth. The daily diameter growth rate increased for 3 days and then decreased for several days before returning to its prebending value.

Relationship between diameter growth and thigmomorphogenetical stimulus

We assessed the relationship between the sum of longitudinal strains induced by bending and the plant responses using the model of mechanosensing (Eq. 1 and 2). A highly significant correlation ($R^2=0.74$) was found between the sum of applied strains on the portion of the stem where the LVDT recorded diameter growth and the growth response quantified as the maximal daily diameter growth rate reached after bending (Fig. 5). In contrast, no significant correlation was found between the compression strain and the diameter growth response (Fig. 6).

Relationship between *PtaZFP2* transcripts level and applied strains

The accumulation of *PtaZFP2* mRNAs after controlled bending was investigated by Northern blot analysis and by real-time quantitative RT-PCR analysis (Fig. 7A and B). Different levels of *PtaZFP2* transcripts were observed according to the applied sum of strains (Fig. 7A). With this method, no transcripts were detected in control (C) plants (i.e., not bent). In contrast with *PtaZFP2* transcripts, levels of *PtaEF-1 α* mRNAs and 18S rRNAs did not vary with the applied sum of strains.

For a better quantification of the plant response at the cellular level, real-time quantitative RT-PCR was used to quantify the relative abundance of *PtaZFP2* transcripts on 15 independent bent samples. All values were standardized to *PtaEF-1 α* transcripts accumulation, which was previously found unaffected by bending in Northern blot analysis, and used as an internal control of segment volume and RNA extraction efficiency. For consistency, the values of the sum of strains were standardized by the volume of the bent segment that has been used for RNA extraction. The standardized sum of strains has thus not unit. *PtaZFP2* transcripts accumulation was highly correlated to the level of the standardized applied sum of longitudinal strains (Fig. 7B). The whole set of data was well fitted by a linear function ($R^2=0.77$), consistent with equations 1 and 2.

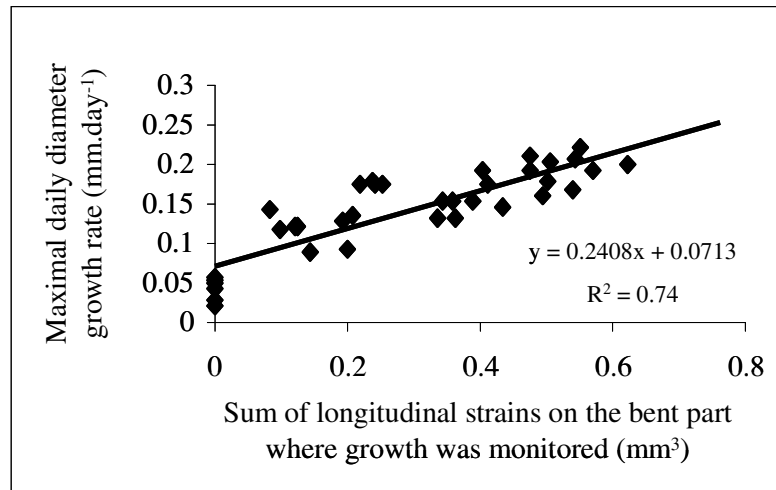


Figure 5. Relationship between the sum of applied longitudinal strains and the diameter growth response.

A linear relationship was observed between the imposed sum of longitudinal strains computed on the width of the stem where the diameter growth was monitored and the maximal daily diameter growth rate reached after bending.

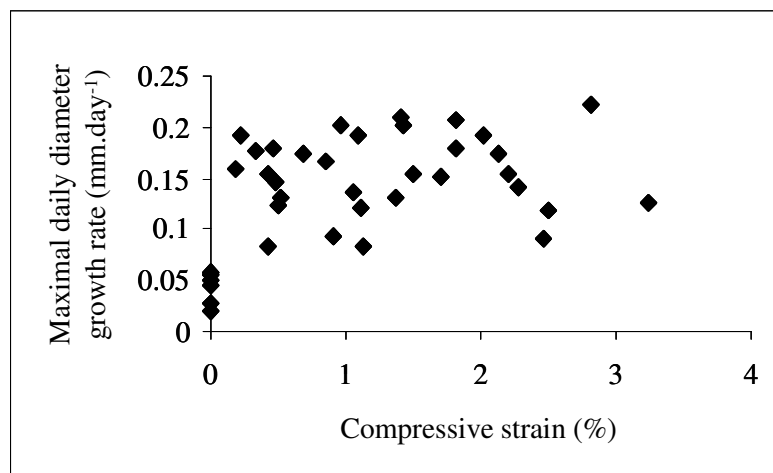


Figure 6. Relationship between the compressive strain and the diameter growth response.

No correlation was found between the compression strain induced by bending on the plastic tube and the maximal daily diameter growth rate reached after bending.

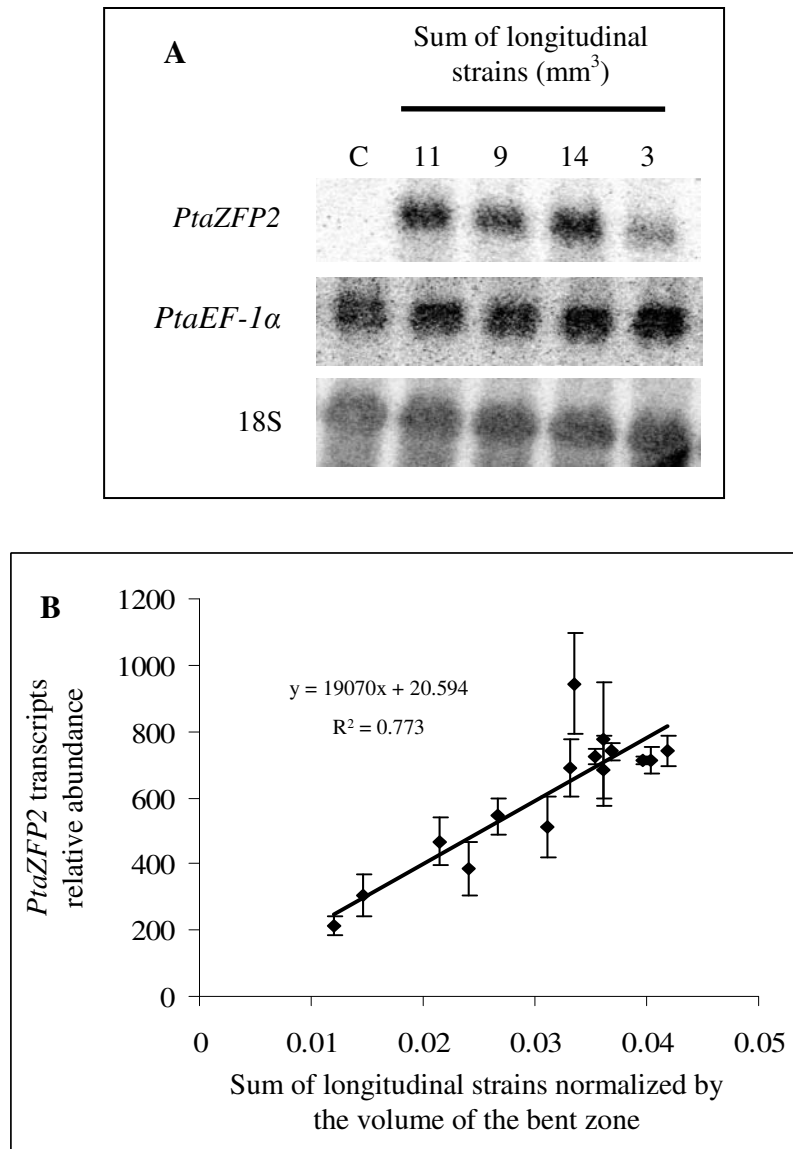


Figure 7. Expression analysis of the poplar *PtaZFP2* gene by Northern blot and the relationship between the level of expression of *PtaZFP2* (quantified by real-time quantitative RT-PCR) and the applied strain.

A, Northern blot analysis revealed the induction of *PtaZFP2* transcripts accumulation 30 min after stem bending on five representative stem samples. Total RNAs (15 µg) were separated on formaldehyde gel, blotted and probed with ³²P-labelled *PtaZFP2* gene-specific probe. RNAs were extracted from the 3-cm long bent part of the stems that were submitted to different levels of strains as indicated on the picture or from the same stem portion on the control (not bent) plant (C). Expressions of *PtaEF-1α* and 18S rRNA were used as loading and transfer controls.

B, Real-time quantitative RT-PCR analysis of the expression of *PtaZFP2* in 15 stems bent within a range of standardized sums of applied strains from 0.012 to 0.042. Each point corresponds to one plant. All values were standardized to *PtaEF-1α* transcript levels. Errors bars correspond to SE. The expression level of *PtaZFP2* was correlated with the standardized sum of longitudinal strains. The relative abundance of *PtaZFP2* transcripts increased linearly with the increase of the standardized sum of applied strains.

DISCUSSION

Effect of a single bending on stem diameter growth

Unexpectedly the first response of diameter growth to a transitory bending is a cessation of growth, similarly to what has been observed for elongation growth. For tomato elongation, cessation of growth was observed a few minutes after bending was applied (Coutand et al., 2000). The reaction time to induce the cessation of diameter growth after bending in poplar was approximately 2 hours. The duration of growth cessation was approximately 1 hour for tomato primary elongation, whereas it was about 4 hours for diameter growth in poplar. In tomato, after the cessation of growth, elongation restarted and the elongation rate progressively reverted to the values observed before bending (Coutand et al., 2000). In the case of diameter growth, the growth stopped, restarted, but progressively reached higher values than those observed before bending for most of the plants for a period of three days. Detailed anatomical and growth kinematical analyses would be necessary to attribute this increase to an increment of the size of the cambial zone, to an increase of growth rate of growing cells or both. After the peak of diameter growth rate was reached, the rate decreased for several days before it reverted back to values observed before bending. Globally, the response appeared to be longer than for tomato elongation: the maximal duration of the observed response was 10 hours in tomato elongation and 11 days in poplar diameter growth.

Two hypotheses can be raised to explain these differences in reaction time: (i) the triggering of the growth response is slower in poplar than in tomato, (ii) the triggering of the growth response in poplar is as fast as in tomato but the onset of growth cessation might be obscured by the recovery of stem diameter after the compression induced by bending. The differences in the duration of the growth response could be also due to the level of applied strains: indeed the sum of strains computed on the whole bent zone (for the purpose of comparison with the tomato experiment) ranged from 0 to 20 mm³ in this experiment with poplar stems, whereas it was much smaller in the tomato stem experiments ranging from 0 to 3 mm³. However, experiments monitoring elongation and diameter growth on the same plants would be necessary to differentiate genetic differences in mechanosensitivity from differences in the responses in terms of elongation and diameter growth.

Quantitative relationship between thigmomorphogenetical stimulus and growth response

When quantifying the growth response by the maximal daily diameter growth rate reached after bending, the plant growth response was correlated with the sum of longitudinal strains. This demonstrated that the biomechanical model of mechanosensing established on tomato (modification of elongation by bending of a zone distant from the primary growth zone) was also applicable in the case of diameter growth, a local response measured at the loaded zone. These results also suggested that in the case of diameter growth, the mechanosensitive control of the response is local.

In contrast to what was found on tomato (Coutand and Moulia, 2000), the linear fit gave better results than a Log shape function, in accordance with the assumption of a linear local mechanosensing in the model.

Despite their different contexts, our results can also be compared with the recent results of Soga et al. (2006) on the effect of hypergravity on the gravimorphism of azuki bean epicotyls. Their work revealed that elongation is reduced by hypergravity and that diameter growth is increased. These physiological responses are characteristic of the thigmomorphogenetical syndrome, despite the fact that they are presented as “gravity resistance” responses by Soga et al (2006). As suggested by Telewski (2006), gravimorphism and thigmomorphogenesis involve a common core of mechanosensing. Interestingly Soga et al. also found a correlation between the modification of growth and the intensity of hypergravity. Hypergravity is a mechanical loading that induces compression strains in tissues, proportionally to the weight of the plant divided by Young’s modulus of the tissue and the area of stem cross section. Since their plant material was probably very homogeneous, tissue strain levels were probably proportional to the intensity of hypergravity, and the results of Soga et al. (2006) are consistent with our results. It should, however, be observed that expressing responses in terms of gravity or stress levels rather than tissue strain can be misleading since only tissue strains are sensed and they may vary for the same gravity or stress level as long as the size and mechanical properties of the plants vary (Coutand and Moulia, 2000).

Quantitative relationship between mechanical loading and gene expression

The expression level of *PtaZFP2* was highly correlated with the level of applied sum of strains in the range of 3 to 24 mm³, corresponding to standardized sum of strain (i.e. volume-averaged strain) in the range of 1 to 4 %. The global fitting was linear ($R^2=0.77$). Even if not significant with our data set, the relative abundance of *PtaZFP2* may start to reach a plateau phase for levels of standardized sums of strains higher than 4%. This could be explained by a slight ovalization of the stem that would reduce the level of applied longitudinal strains so that the computation of sum of strains by the classical equation of beam theory may overestimate the computed sum of strains. In addition, a plateau phase could also be due to a saturation of the mechanosensing apparatus. Care should thus be taken before extending the sum-of-strains model to very large strains levels.

Nevertheless, in the range of small sums of longitudinal strains (3 to 12 mm³, corresponding to volume averaged strains in the range of 1 to 4 %), the induction factor of *PtaZFP2* was linearly dependent on the sum of longitudinal strains. The relative abundance of *PtaZFP2* transcripts over the control was thus proportional to the level of applied sums of longitudinal strains, as assumed in the model (Eq. 1). The model of mechanosensing was therefore also valid at the cellular level for the earliest primary responding gene known in the mechanotransduction pathway. To our knowledge, the only studies that present a quantitative relationship between mechanical loading and the level of gene expression are those focused on the effects of hypergravity conditions (Soga et al., 2007); *VaXTHS4* is down-regulated by hypergravity and the level of *VaXTHS4* expression is correlated with the applied level of hypergravity with a logarithmic function. The alpha-tubulin gene is up-regulated by hypergravity and the level of expression is dependent on the level of hypergravity (Saito et al., 2003). As argued previously, plant responses in these studies are characteristic of thigmomorphogenetic responses and may reflect the quantitative cellular response to strain sensing, although they were initially described as “gravity resistance” responses. But, as argued earlier, the relation of gene expression with hypergravity level is likely to be casual to the fact that plant material with homogeneous sizes and mechanical properties were used, and to reflect a more integrative and mechanically sounded relation with the sum of the strains.

It thus appears that mechanosensing can quantitatively control the level of expression of some genes in plants. Mechanosensitive activation of genes following quantified mechanical tissue strain has also been reported in animals (TWIST expression in drosophila (Supatto et al., 2006)), but no quantitative action law for gene expression has yet been established.

How mechanosensing alters the transcription of genes remains an open question. The mechanoperception/transduction of external mechanical signals is thought to be insured, at least partly, by stretch mechanosensitive channels of the plasma membrane releasing cytoplasmic calcium that in turn modulate gene expression through a cascade of molecular events (Chehab et al., 2009; Haswell et al., 2008). Recently, the study of Xiong et al. (2004) evidenced that the nuclei has the capacity to perceive mechanical signals resulting in autonomous calcium movements into the nucleoplasm. These calcium movements are conditioned by the environment of the nuclei notably by the cytoplasmic pH. The ability of the nucleus to perceive directly mechanical signals implies that mechanical external signals have to be transferred to the nucleus. This possibility is in accordance with the ideas of Ingber (2006; 2008) on cellular tensegrity. Ingber (2008) proposed the animal cell to be composed of different and hierarchised tensegrity structures (implying integrins, local adhesions and the cytoskeleton linking the extracellular matrix to the nucleus) that span from the macro to the nanoscale and which focuses stresses on specific mechanotransducer molecules and structures, such as the nucleus. Such a system has not been so precisely described in plants but integrin-like proteins have been identified (Sakurai et al., 2004), a continuum cytoskeleton-plasma membrane-cell wall has been described (Baluska et al., 2003) and local adhesions plasma membrane-cell wall have been evidenced (Hayashi et al., 2006). The mechanical models of cellular tensegrity proposed in animals could thus be also a good candidate model for mechanosensing in plants. But systems biology models integrating quantitatively strain sensing with gene expression and growth responses were still lacking in both plants and animals.

CONCLUSION

This paper presents the effect of a single controlled bending on the diameter growth of young poplars and on the expression of a mechanosensitive gene, *PtaZFP2*. The results showed that a single transitory bending was sufficient to modify plant diameter growth for several days. Bending first stopped diameter growth; the diameter growth rate then increased for several days and, finally, returned to basal values. Beam theory was used to compute the longitudinal strains induced by the controlled loading for each bent stem. Using the model of mechanosensing initially developed in a study of thigmomorphogenesis on tomato primary growth, we were able to establish that relationships between the applied mechanical stimulus

and the plant responses exist. This analysis revealed that the biomechanical “Sum-of-strains” model of mechanosensing established for tomato stem elongation was also applicable in the case of radial growth. It is interesting to note that the “Sum-of-strains” model was also applicable at the cellular level; the results showed that the relative abundance of *PtaZFP2* transcripts was highly and linearly correlated to the applied sum of strains. To our knowledge, this is the first time that a quantitative relationship between the mechanical loading (the applied level of longitudinal strains in the stem tissues) and the level of expression of a mechanosensitive gene has been established. This approach can be extended to other genes from the mechanosensitive transcription network and should give insightful in the ordering of genes expression along increasing mechanical stimulation, and in defining possible differences in the sensitivity of their expression. Moreover, a common generic integrative model for the various responses to stem mechanical stimulation can be defined combining the “sum-of-strains” model for mechanosensing and the dose-response curves for elongation, diameter growth and even the expression of a primary mechanosensing gene. These results open up new perspectives in the area of system biology of plant growth under mechanical loading.

Quantification of the strains that plants are submitted to under natural conditions is still lacking (Rodriguez et al., 2008). However, the range of applied strains in this study was wide enough to cover the ecological range of strains. Moreover, now that the effect of a single controlled bending has been characterized, it is possible to use these results as a basis to analyze plant responses after several mechanical loadings. This will allow us to understand the regulation of mechanosensitivity and its consequences on the acclimation to wind through thigmomorphogenesis (Moullia et al., 2006). In particular, it is now possible to determine whether or not plant growth or molecular responses are dependent on plant mechanical history, i.e., if the plant response is the same, higher or lower after several bendings in order to characterize and quantify the acclimation process that is taking place while the plant is mechanically stimulated.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and culture conditions

Young poplars (*Populus tremula* × *alba* cv 717-1B4) were obtained by *in vitro* micropropagation and grown on nutrient solution (Morizet and Mingeau, 1976) after acclimation (see Martin et al. (2009) for more details). Trees were grown in a growth chamber (L/D 16h/8h at 40 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ at 24°C/20°C with relative humidity of $60 \pm 10\%$). Two months after micropropagation, the poplars were ready to be used in experiments; stems were about 35-cm high at this stage. The diameters of tested stems ranged from 4.3 to 6.3 mm with an average diameter of 5.18 ± 0.51 mm.

Bending experiments

For bending experiments, plants were transferred to another growth chamber with the same environmental conditions as for breeding. Plants were aligned in a vertical position along a metal bar to which they were attached with individual clamping rings. Foam was rolled around each stem in order to avoid stem wounds when the clamping ring was tightened. During entire experiment, roots bathed in a nutrient solution that was oxygenated by four aquarium pumps generating micro bubbles from foam tubes placed at the bottom of the vat. Two vats (containing 100 L of nutrient solution) were available in the same growth chamber, with the possibility of experimenting on a set of eight plants (four plants on each vat) at the same time. During plant installation, plant leaves were removed in the basal part of the stem that was to be bent, in order to avoid uncontrolled mechanical stimuli on leaves during controlled bending (see below).

Bending device

An original experimental device was developed in order to impose a controlled level of strains to the stem; the basal part of the stem was pushed against a plastic tube in order to curve the stem and then returned to its initial position.

This bending device was used for growth experiments as well as for experiments to study the level of expression of *PtaZFP2*. Because the installation induced mechanical

perturbation of plant growth, plants in both types of experiments were installed and left for five days before the application of a controlled bending in order to avoid interactions of the installation with the effects of the controlled bending.

In growth experiments, the diameter growth of each plant was monitored by a linear voltage displacement transducer (LVDT, DF/5.0 LIN 3M, Solartron Metrology Ltd.) before, during and after the transitory stem bending. The LVDT was placed at approximately 10 cm from the stem collar in the middle of an internode. Each LVDT was linked to an Omega bus (Omega, D5131, ± 5 Volts) linked to a computer where an in-house data acquisition program (LVDT.exe, B Adam, INRA umr PIAF) recorded average growth per minute. Each plant of the two vats was equipped with a LVDT so that each of the two Omega buses gathered data from four plants.

For each plant, the imposed state of deformation induced by bending was computed using the beam theory principle.

Quantification of the applied strains

The stem was pushed against a plastic tube whose diameter was known so that the stem was thus submitted to a single bending controlled in terms of deformation. The longitudinal strain state that the plant was subjected to could be computed. Within the framework of beam theory, under the assumption of small curvature and small strain, the cross section remains plane in the bent state and the maximal longitudinal strain is given by the product of the stem radius (r_{stem}) and the curvature of the neutral line (κ):

$$\varepsilon_{LL\max} = \kappa \cdot r_{stem} \quad (4)$$

The curvature of the central line can be computed as the inverse of the sum of the radius of the tube and the stem (Fig. 1B):

$$\text{With } \kappa = \frac{1}{r_{tube} + r_{stem}} \quad (5)$$

That results in:

$$\varepsilon_{LL\max} = \frac{1}{r_{tube} + r_{stem}} \bullet r_{stem} \quad (6)$$

Following the conceptual framework developed in the paper of Coutand and Moulia (2000), if we consider that the perception dS is at the local level and that these perceptions add up to generate a signal S that triggers plant reaction, the signal perceived by the plant is

the integral of local perceptions dS and is proportional to the sum of longitudinal applied strains (see Eq. 1).

Taking the model of mechanosensing established from the work on tomato, i.e., assuming a sensory function with no threshold and a scattering of the sensory function in the stem, the effective signal is proportional to the sum of strains on the bent part and was computed by Coutand and Moulia (2000) as:

$$S_{strains} = \frac{2}{3} r_{stem}^3 \cdot \kappa \cdot h \quad (7)$$

where r_{stem} is the radius of the stem in the middle of the bent part, κ is the imposed curvature and h is the length of the considered zone.

The diameter of the tube to be used to impose a given sum of strains is thus written as:

$$r_{tube} = \frac{2}{3} \frac{r_{stem}^3 h}{S_{strains}} - r_{stem} \quad (8)$$

Given the length of the bent zone (taken equal to 30 mm) and the radius of the stems, we used Equation 6 to create a range of applied sums of strains.

The imposed level of the sums of strains ranged from 0 to 20 mm³. Tubes of different diameters (40, 50, 75, 90, 140, 160, 200 mm) were used to control the level of applied strains.

Assuming that the perception is local and that the sensory function is scattered along the stem, we assumed that the effective thigmomorphogenetical signal was proportional to the sum of strains computed over the length of the response site: 1 mm for diameter growth and 30 mm for *PtaZFP2* expression (Fig. 1B).

Quantification of the growth response

Before checking the capacity of these strains integrals to explain the observed growth response, it was necessary to find a way to quantify the growth response. The diameter growth response was also quantified by the maximal average daily diameter growth rate reached by the plant after bending.

Quantification of gene expression

Plants were bent as explained above for growth experiments and harvested 30 minutes after bending was applied. Thirty mm of the bent part of each plant was cut and immediately placed in liquid nitrogen.

Since the aim of the study was to determine if some quantitative relationship could be found between the applied level of strains and the expression level of *PtaZFP2*, the mRNA abundance of *PtaZFP2* was measured plant by plant. Five plants were used as controls.

RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNAs were extracted from about 150 mg of bent stems using CTAB extraction buffer as described by Chang et al. (1993), and then treated with RNase-free RQ1 DNase (Promega). RNA was quantified spectrophotometrically and checked by agarose gel electrophoresis. First-strand cDNA was synthesized from 1 µg total RNA using oligodT and SuperScript III (Invitrogen), according to manufacturer's instructions.

Northern blot hybridization

For Northern blot analysis, a *PtaZFP2* gene-specific probe of 287 bp was generated by PCR with a specific pair of primers, Pe1S 5'-CGTGCGA GTCACAAGAAACC-3' and Pe1AS 5'-CACAGAACTCTCTTGCTGCT-3', labeled with α^{32} -P-dCTP using a Ready-To-Go, DNA Labeling Beads kit (Amersham) and then purified with a Cleanmix kit (Euromedex), according to manufacturer's recommendations. Total RNAs (15 µg) were separated by 1% agarose gel electrophoresis after denaturation with formaldehyde and blotted onto a nylon membrane Hybond-N+ (Amersham). The Northern hybridization was carried out with a NorthernMax kit (Ambion). Membranes were then exposed to a phosphorimager screen (Kodak) for 4 h. Signal quantification was made using Quantify One software (Bio-Rad).

Real-Time Quantitative RT-PCR experiments

Real-time RT-PCR amplifications were done using an iCycler IQ (Bio-Rad) and SYBR green as a fluorescent dye. Each PCR reaction (30 µl) contained the following: cDNA (4 µl of 1:40 dilution of the first cDNA strands), PCR buffer (1X), MgCL₂ (1.66 mM), dNTP mix (200 µM of each), primers (0.3 µM of each), Platinum Taq DNA polymerase (0.5 unit, Invitrogen), and SYBR green I (1/1000, Sigma).

After a heat step at 94°C for 5 min, PCR cycling conditions were as follows: 40 cycles of denaturation (94°C, 15 s), annealing (61°C, 15 s) and elongation (72°C, 20 s), ending with a final elongation step at 72°C for 5 min.

PtaZFP2 transcripts were detected by amplifying 287 bp with primers Pe1S and Pe1AS. The reference gene *EF-1α* (elongation factor-1α) transcripts were amplified using the primers EF1S 5'-GACAACTAGGTACTACTGCACTGTC-3' and EF1AS 5'-TTGGTGGACCTCTCGATCATG-3'. Relative quantitative abundance (Qr) of *PtaZFP2* transcripts was calculated by comparison to the expression of *EF-1α* using the delta-delta method mathematical model (Mc Maugh and Lyon, 2003):

$$Qr = \frac{2^{(C_{control}-C_{treated})_{PtaZFP2}}}{2^{(C_{control}-C_{treated})_{EF-1\alpha}}} \quad (9)$$

where C is the cycle number of PCR to reach the quantitative detection threshold. Specificity of amplification was confirmed by determining the melt curves for the PCR products at the end of each run and by using a gel electrophoresis.

Sequence data from this article can be found in the GenBank/EMBL data libraries under accession number FM172949.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Ginette Faure and Christelle Boisselet for their help with plants production and preparation of nutrient solutions. We would like to thank Prof. Jeronimidis for the general discussion about this work, and Gail Wagman for reading and correcting the English.

LITERATURE CITED

- Baluska F, Samaj J, Wojtaszek P, Volkmann D, Menzel D** (2003) Cytoskeleton-plasma membrane-cell wall continuum in plants. Emerging links revisited. *Plant Physiol.* **133**: 482-491
- Biddington NL, Dearman AS** (1985) The Effect of Mechanically Induced Stress on the Growth of Cauliflower, Lettuce and Celery Seedlings. *Ann Bot* **55**: 109-119
- Biddington NL** (1986) The Effects of Mechanically-Induced Stress in Plants - a Review. *Plant Growth Regul* **4**: 103-123
- Boyer N** (1967) Modification de la croissance de la tige de bryone (*Bryonia dioica*) à la suite d'irritations tactiles. *CRAS.* **267**: 2114-2117
- Braam J, Davis RW** (1990) Rain-Induced, Wind-Induced, and Touch-Induced Expression of Calmodulin and Calmodulin-Related Genes in *Arabidopsis*. *Cell* **60**: 357-364
- Braam J** (2005) In touch: plant responses to mechanical stimuli. *New Phytol* **165**: 373-389
- Chang SJ, Puryear J, Cairney J** (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol Biol Rep* **11**: 113-116
- Chehab EW, Eich E, Braam J** (2009) Thigmomorphogenesis: a complex plant response to mechano-stimulation. *J Exp Bot* **60**: 43-56
- Ciftci-Yilmaz S, Mittler R** (2008) The zinc finger network of plants. *Cell Mol Life Sci* **65**: 1150-1160
- Coutand C, Julien JL, Moulia B, Mauget JC, Guitard D** (2000) Biomechanical study of the effect of a controlled bending on tomato stem elongation: global mechanical analysis. *J Exp Bot* **51**: 1813-1824
- Coutand C, Moulia B** (2000) Biomechanical study of the effect of a controlled bending on tomato stem elongation: local strain sensing and spatial integration of the signal. *J Exp Bot* **51**: 1825-1842
- Coutand C, Dupraz C, Jaouen G, Ploquin S, Adam B** (2008) Mechanical stimuli regulate the allocation of biomass in trees: Demonstration with young *Prunus avium* trees. *Ann Bot* **101**: 1421-1432
- Daudet FA, Ameglio T, Cochard H, Archilla O, Lacoïnte A** (2005) Experimental analysis of the role of water and carbon in tree stem diameter variations. *J Exp Bot* **56**: 135-144
- Giovannelli A, Deslauriers A, Fragnelli G, Scaletti L, Castro G, Rossi S, Crivellaro A** (2007) Evaluation of drought response of two poplar clones (*Populus x canadensis*

- Monch 'I-214' and P-deltoides Marsh. 'Dvina') through high resolution analysis of stem growth. *J Exp Bot* **58**: 2673-2683
- Hamant O, Heisler MG, Jonsson H, Krupinski P, Uyttewaal M, Bokov P, Corson F, Sahlin P, Boudaoud A, Meyerowitz EM, Couder Y, Traas J** (2008) Developmental Patterning by Mechanical Signals in Arabidopsis. *Science* **322**: 1650-1655
- Haswell ES, Peyronnet R, Barbier-Brygoo H, Meyerowitz EM, Frachisse JM** (2008) Two MscS homologs provide mechanosensitive channel activities in the Arabidopsis root. *Curr Biol* **18**: 730-734
- Hayashi T, Harada A, Sakai T, Takagi S** (2006) Ca²⁺ transient induced by extracellular changes in osmotic pressure in Arabidopsis leaves: differential involvement of cell wall-plasma membrane adhesion. *PCE* **29**: 661-672
- Ingber DE** (2006) Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *Faseb J* **20**: 811-827
- Ingber DE** (2008) Tensegrity-based mechanosensing from macro to micro. *P Bio Mol Bio* **97**: 163-179
- Jacobs MR** (1954) The effect of wind sway on the form and development of *Pinus radiata* D. Don. *Aus J Bot* **2**: 35-51
- Jaffe MJ** (1973) Thigmomorphogenesis. The response of plant growth and development to mechanical stimulation. *Planta* **114**: 143-157
- Jaffe MJ, Biro R, Bridle K** (1980) Thigmomorphogenesis: calibration of the parameters of the sensory function in beans. *Physiol Plant* **49**: 410-416
- Larson PR** (1965) Stem forms of young *Larix* as influenced by wind and pruning. *For Sci* **11**: 412-424
- Latimer JG, Pappas T, Mitchell CA** (1986) Growth-Responses of Eggplant and Soybean Seedlings to Mechanical-Stress in Greenhouse and Outdoor Environments. *J Am Soc Hort Sci* **111**: 694-698
- Leblanc-Fournier N, Coutand C, Crouzet J, Brunel N, Lenne C, Moulia B, Julien JL** (2008) Jr-ZFP2, encoding a Cys2/His2-type transcription factor, is involved in the early stages of the mechano-perception pathway and specifically expressed in mechanically stimulated tissues in woody plants. *PCE* **31**: 715-726
- Lee D, Polisensky DH, Braam J** (2005) Genome-wide identification of touch- and darkness-regulated Arabidopsis genes: a focus on calmodulin-like and XTH genes. *New Phytol* **165**: 429-444

- Martin L, Leblanc-Fournier N, Azri W, Lenne C, Henry C, Coutand C, Julien JL** (2009) Characterization and expression analysis under bending and other abiotic factors of PtaZFP2, a poplar gene encoding a Cys2/His2 zinc finger protein *Tree Physiol* **29**: 125-136
- McMaugh SJ, Lyon BR** (2003) Real-time quantitative RT-PCR assay of gene expression in plant roots during fungal pathogenesis. *Biotechniques* **34**: 982-+
- Meng SX, Lieffers VJ, Reid DEB, Rudnicki M, Silins U, Jin M** (2006) Reducing stem bending increases the height growth of tall pines. *Journal of Experimental Botany* **57**: 3175-3182
- Morizet J, Mingeau M** (1976) Effect of Environment on Water-Uptake, as Studied on Beheaded Exuding Tomato .1. Role of Nutrients. *Annales Agronomiques* **27**: 183-205
- Moulia B, Fournier M** (1997) Mechanics of the maize leaf: A composite beam model of the midrib. *J Materials Science* **32**: 2771-2780
- Moulia B, Coutand C, Lenne C** (2006) Posture control and skeletal mechanical acclimation in terrestrial plants: Implications for mechanical modeling of plant architecture. *Am J Bot* **93**: 1477-1489
- Rodriguez M, De Langre E, Moulia B** (2008) A scaling law for the effects of architecture and allometry on tree vibration modes suggests a biological tuning to modal compartmentalization. *Am J Bot* **95**: 1523-1537
- Saito Y, Soga K, Wakabayashi K, Hoson T** (2003) Increase in expression level of alpha-tubulin gene in Arabidopsis seedlings under hypergravity conditions. *Biol Sci Space* **17**: 177-178
- Sakurai M, Pak JY, Muramatsu Y, Fukuhara T** (2004) Integrin-like protein at the invaginated plasma membrane of epidermal cells in mature leaves of the marine angiosperm *Zostera marina* L. *Planta* **220**: 271-277
- Soga K, Wakabayashi K, Kamisaka S, Hoson T** (2006) Hypergravity induces reorientation of cortical microtubules and modifies growth anisotropy in azuki bean epicotyls. *Planta* **224**: 1485-1494
- Soga K, Wakabayashi K, Kamisaka S, Hoson T** (2007) Effects of hypergravity on expression of XTH genes in azuki bean epicotyls. *Physiol Plant* **131**: 332-340
- Supatto W, Debarre D, Moulia B, Brouzes E, Martin JL, Farge E, Beaurepaire E** (2005) In vivo modulation of morphogenetic movements in *Drosophila* embryos with femtosecond laser pulses. *PNAS* **102**: 1047-1052

- Telewski FW, Pruyn ML** (1998) Thigmomorphogenesis: a dose response to flexing in *Ulmus americana* seedlings. *Tree Physiol* **18**: 65-68
- Telewski FW** (2006) A unified hypothesis of mechanoperception in plants. *Am J Bot* **93**: 1466-1476
- Xiong TC, Jauneau A, Ranjeva R, Mazars C** (2004) Isolated plant nuclei as mechanical and thermal sensors involved in calcium signalling. *Plant J* **40**: 12-21

Chapitre 3

*Caractérisation physiologique
et moléculaire de
l'acclimatation des plantes à
des flexions multiples*

La capacité des plantes à croître malgré un environnement mécanique fluctuant suggère l'existence d'un processus d'acclimatation aux sollicitations mécaniques multiples (Mouliat *et al.*, 2006). Au cours des chapitres précédents, nous avons caractérisé, en termes quantitatifs et cinétiques, deux réponses locales à une flexion unique de la tige chez le peuplier. La validité du modèle intégratif de la mécanoperception pour des réponses locales nous permet désormais de prédire l'intensité du stimulus mécanique appliqué à la tige. Ces différents résultats constituent la base de connaissances nécessaires pour pouvoir appréhender l'effet de sollicitations mécaniques multiples sur les plantes. En effet, si on observe une variabilité des réponses des plantes suite à des flexions multiples, celle-ci peut provenir d'au moins deux sources : (i) une variabilité liée à l'intensité du stimulus mécanique, (ii) une variabilité liée à des modifications intrinsèques aux plantes au cours des flexions répétées (acclimatation). Etant capables de contrôler l'intensité de stimulus mécanique appliqué, nous pouvons caractériser si il existe des variabilités de réponses liées à un processus d'acclimatation.

Les travaux présentés dans ce chapitre montrent les effets à court terme de l'application de flexions multiples sur la réponse moléculaire rapide (30 minutes après la sollicitation mécanique) mais aussi sur la réponse de croissance en diamètre de jeunes peupliers cultivés en hydroponie. Les études moléculaires ont été réalisées par RT-PCR quantitative en temps réel sur quatre gènes mécanosensibles primaires *PtaZFP2*, *PtaTCH2*, *PtaTCH4* et *PtaACS6*. La croissance en diamètre a été mesurée à l'aide d'un capteur de déplacement LVDT. Pour réaliser cette étude, nous avons appliqué des flexions transitoires contrôlées des tiges dans une gamme de sommes de déformations restreinte afin de pouvoir comparer facilement les réponses obtenues. Les flexions multiples ont été effectuées toutes les 24h (faible fréquence) ou espacées de plusieurs jours afin de rechercher l'existence éventuelle de périodes de désensibilisation.

Ce troisième chapitre est présenté sous forme d'une publication soumise à la revue *Journal of Experimental Botany*.

Kinetics of physiological and molecular responses in the acclimation of plants to multiple mechanical loadings

Ludovic Martin¹, Nathalie Leblanc-Fournier¹, Jean-Louis Julien¹, Bruno Moulia², Catherine Coutand²

¹ Université Blaise Pascal, UMR 547 PIAF, F-63000 Clermont-Ferrand, France

² INRA, UMR 547 PIAF, F-63100 Clermont-Ferrand, France

Corresponding author

Jean-Louis Julien

Tel: +33473407924

Fax: +33473407916

Email: J-Louis.JULIEN@univ-bpclermont.fr

Abstract

Wind, the most important environmental mechanical stress, displays a broad range of frequency and intensity. In order to grow in such continuously changing wind conditions, plants have had to develop acclimation abilities. Here we studied the time course of acclimation of young poplars (*Populus tremula* × *Populus alba*) to multiple stem bendings as reflected in diameter growth and the expression of four primary mechanosensitive genes *PtaZFP2*, *PtaTCH2*, *PtaTCH4* and *PtaACS6*. Young trees were submitted to (i) one transient bending per day for several days or (ii) two bendings 1–14 days apart. As soon as a second bending was applied, a diminution of growth and molecular responses to subsequent bending were observed. The minimum rest periods between two successive loadings necessary to recover a response similar to that observed after a single bending were 7 days and 5 days for growth and molecular responses, respectively. The overall results show that (i) plants acclimate rapidly to mechanical loading and (ii) a desensitization period of a few days occurs after a single transitory bending. This acclimation process appears to be faster for primary molecular responses than for diameter growth, providing a basis for a mechanistic analysis of response sensitivity to mechanical loadings such as wind.

Key words: acclimation, C2H2 zinc finger protein, diameter growth, mechanical stimulus, *Populus*, *TOUCH* genes.

Introduction

During their growth and development, plants and animals are exposed to various mechanical stimuli, both internal (Ingber, 2005; Hamant *et al.*, 2008) and external (Moulia *et al.*, 2006). The ability of plants to adapt to these stimuli and to other biotic and abiotic stresses is crucial for their survival, as they cannot move away from a stressful situation (Potters *et al.*, 2007). The ability to perceive and respond to mechanical stimuli has been studied at both cellular and organism levels (see reviews in Braam, 2005; Moulia *et al.*, 2006; Telewski, 2006). In the case of external mechanical loads such as wind, touch or snow (Telewski, 2006), the growth response has been called thigmomorphogenesis (Boyer, 1967; Jaffe, 1973). The thigmomorphological response of the stem is generally characterized by reduced elongation and in some species stimulation of radial growth (Jaffe and Forbes, 1993; Telewski and Pruyn, 1998; Coutand *et al.*, 2008).

In their natural environment, plants are continuously exposed to wind loads. A major feature of the mechanical stimulations induced by wind loads is their broad range of frequency and intensity (de Langre, 2008). This raises the question of how plants respond to successive, recurring mechanical loadings. It has been demonstrated for other abiotic stresses that previous exposure to the same stress alters subsequent plant responses (Bruce *et al.*, 2007). Here such modified responses are subsumed by the term acclimation. For these abiotic stresses, these altered responses involve the storage of information resulting from a first exposure to a defined stress, called stress imprint by Bruce *et al.* (2007). For example, in response to drought, cold or wounding, plants increase their tolerance as a result of previous exposure to these stresses through specific eco-physiological and molecular mechanisms (Knight *et al.*, 1998; Jakab *et al.*, 2005; Bruce *et al.*, 2007). Nevertheless, little is known about the acclimation of plants to several mechanical loadings, as regards either eco-physiological or molecular responses. The effects of applying different numbers of bendings were studied by Telewski and Pruyn (1998) on young *Ulmus Americana* L.. After three weeks of treatment, trees exhibited greater sensitivity to a low dose of bending (5 per day) than to a high dose (80 per day). Trees continued to respond to increasing amounts of mechanical stress, but at an exponentially declining rate (Telewski and Pruyn, 1998). Mechanoperception relies on the sensing of tissue strain (the relative increment of tissue volume due to the mechanical loading) rather than forces or tissue stresses (Coutand and Moulia, 2000; Moulia *et al.*, 2006). Thus for mechanical reasons, the relation between the thigmomorphogenetic response and the external force applied to the plant depends on the size of the stem and its mechanical

properties. In long-term studies such as that of Telewski and Pruyn (1998), the size and mechanical properties of the stems changed with time and treatment, thereby changing the strains imposed on the stem at each bending, and preventing accurate assessment of changes in mechanosensitivity. In a more closely controlled experiment using bending at constant applied displacement and eight bendings per day for 6 weeks, Coutand *et al.* (2008) found a slight increase in tissue strains over time (due to diametral growth). The growth response of the trees induced by these repetitive bendings exhibited a general tendency to decrease, suggesting an acclimation of mechanosensitivity. However, this acclimation could not be quantified, because the response to a single bending was not characterized. The effects of multiple mechanical loadings were studied by measuring their impact on plant radial and/or height growth after several days, and nothing is known about their short-time effects. Finally, to quantify the acclimation of plants to several bendings it is necessary to (i) quantify the strain stimulus for each bending, (ii) analyse plant response after a single bending and (iii) study the detailed time courses of responses to multiple bendings.

A biomechanical quantitative study of longitudinal growth response to a single transient stem bending in tomato showed that the duration of this response was linked to the applied level of tissue strains (Coutand and Moulia, 2000). A mechanoperceptive model, called the “sum of strains” model, was proposed (Coutand and Moulia, 2000). This model allows the quantification of the amount of mechanical stimulus sensed by the plant by computing the sum of longitudinal strains over the deformed tissues, thereby taking into account the mechanoperceptive effect of plant size. This mechanoperceptive model was shown to apply to diameter growth response in poplar, and also to gene expression (Coutand *et al.*, 2009). In addition, a device was designed to impose a controlled constant curvature, as an input for the “sum of strains” model (Coutand *et al.*, 2009). These tools are well suited to quantify the effect of each single bending during multiple loadings and to study the possible acclimation of thigmomorphogenetic physiological and molecular responses.

In contrast to scant results at the plant scale, plant acclimation to various abiotic stresses such as cold, salt and osmotic stresses has been studied at the molecular level (Kreps *et al.*, 2002; Bruce *et al.*, 2007). For mechanical stimuli, numerous molecular actors have been shown to be involved in the signal transduction pathway leading to thigmomorphogenesis, and a general flow chart of mechanoperception in plants has been proposed (Lee *et al.*, 2005; Telewski, 2006). One of the promptest changes observed (1–2 min after a mechanical stimulation) is an increase in intracellular calcium and reactive oxygen species (Knight *et al.*, 1992; Apel and Hirt, 2004). Temporally, these changes occur just before induction of the

expression of various genes (Telewski, 2006). The first mechano-controlled genes identified are the *TOUCH* genes (*TCH*) which were shown to be induced rapidly and transiently after a simple mechanical stimulation, through touching *Arabidopsis thaliana* L. (Braam and Davis, 1990). *TCH1-3* encodes calmodulins or calmodulin-like proteins (Braam, 1992; Sistrunk *et al.*, 1994) and *TCH4* encodes a xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase (Xu *et al.*, 1995). Another primary response gene to mechanical stimulation is the *ACC synthase* (*ACS*) involved in ethylene biosynthesis. *ACC synthase* mRNAs accumulate 10 min after bending of *Vigna radiata* L. leaves (Botella *et al.*, 1995) and *P. tremula* × *P. alba* stems (Martin *et al.*, 2009). Expression modification of these molecular actors in response to multiple mechanical loadings has not been characterized except for *ACS6* (Arteca and Arteca, 1999). However, in that study, the multiple mechanical loadings (touch) were not truly quantified, so a dose-response curve could not be plotted. More recently, work on *Juglans regia* L. and *P. tremula* × *P. alba* revealed rapid induction of *JrZFP2* and *PtaZFP2* genes encoding Cys2/His2 zinc finger proteins after stem bending and only in strained tissues (Leblanc-Fournier *et al.*, 2008; Martin *et al.*, 2009). The relative abundance of *PtaZFP2* transcripts after a single bending was linearly correlated with the standardized sum of strains in the range 1–4% (Coutand *et al.*, 2009). Thus this gene appears to be a suitable marker to study mechanoperception regulation.

The aim of this work was to study, quantitatively and at high time resolution, the time course of physiological and molecular processes involved in the acclimation of trees to repeated controlled bendings quantified using the “sum of strains” model of mechanosensing. The short-time effects of multiple stem bendings on young poplars were studied (i) on diameter growth response, and (ii) on the expression of four primary mechanosensitive genes *PtaZFP2*, *PtaTCH2*, *PtaTCH4* and *PtaACS6*. The diameter growth was monitored continuously using linear voltage differential transducers (LVDTs). Gene expression kinetics were followed using real-time quantitative RT-PCR experiments. First, the responses to one transient bending per day for several days were studied. It was found that a single bending did not saturate the plant perceptive/responsive system and that plant acclimation to mechanical loadings took place at the second bending. To gain deeper insight into the duration of information storage after a mechanical loading, we then varied the time interval between two successive bendings from 1 to 14 days. The results revealed that the time to fully recover maximal sensitivity/responsiveness was about 5 days for molecular responses and about 7–10 days for growth responses.

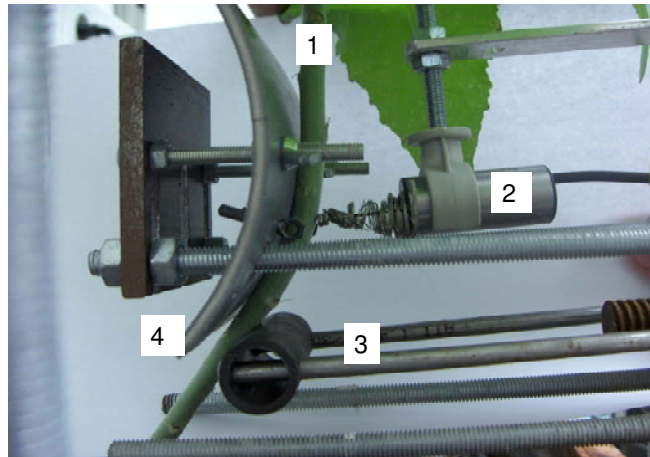


Fig. 1 Bending device.

The stem (1) diameter growth was measured continuously by a linear voltage differential transducer (2). Controlled bending was applied by means of a moving arm (3) that pushed the stem against a plastic tube (4).

Materials and methods

Plant material and culture conditions

Hybrid poplars (*Populus tremula* × *Populus alba*, clone INRA 717-1B4) were obtained by *in vitro* micropropagation on Murashige and Skoog medium (Murashige and Skoog, 1962), and grown on nutrient solution (Morizet and Mingeau, 1976). Trees were grown in a growth chamber (L/D 16 h / 8 h at 24 °C / 20 °C with RH 70 ± 10%). Three months after micropropagation the poplars were used in experiments; at this stage, their stems were about 40 cm tall. The diameters of tested stems ranged from 4.06 mm to 5.51 mm with an average diameter of 4.71 mm (± 0.43).

Bending treatments

The bending experiments were performed in a growth chamber under the same environmental conditions as during plant breeding. Plants were set vertically on a metal bar to which they were fixed with individual clamping rings. Plants were set vertically and fixed with individual clamping rings on a horizontal metal bar. Foam was rolled around each stem before tightening the clamping rings to avoid stem wounds. Before fixing the plants, basal leaves below the clamping rings were removed to avoid uncontrolled mechanical stimuli on leaves and facilitate bending application and growth measurements.

For both growth and gene expression experiments, the mechanical stimulus was applied on the trees by transiently bending the basal part of the stem against a plastic tube to obtain a controlled, homogeneous bending curvature (Fig. 1), as detailed in Coutand *et al.* (2009). In all the experiments, plants were left undisturbed for 5 days after installation to avoid interactions between the effect of uncontrolled mechanical stimulation during the installation and the effects of the controlled bending, and to let them recover their maximal perception/responsiveness capacities before the application of the first controlled stem bending.

For each plant, the level of mechanical stimulus was quantified by calculating the imposed strain field induced by bending using the beam theory and by computing the sum of strains according to the “sum of strains” mechanosensing model (Coutand and Moulia, 2000; Coutand *et al.*, 2009). In the controlled bending device (Fig. 1), the sum of longitudinal

strains S_{strains} in the stem tissues depends on the diameter of the tube and on the diameter of the stem in the bent zone (Coutand and Moulia, 2000; Coutand *et al.*, 2009).

$$S_{\text{strains}} = \frac{2}{3} r_{\text{stem}}^3 \left(\frac{1}{r_{\text{tube}} + r_{\text{stem}}} \right) h$$

where r_{stem} is the radius of the stem in the middle of the bent part and h is the length of the considered zone.

r_{stem} is subjected to natural variations between plants and over time with growth. Tubes of different diameters (75, 90, 140 and 160 mm) were thus used, depending on the actual diameter of the stem, to apply a level of sum of strains within a restricted range. However, for practical reasons the tubes could not be changed all the time, and so this compensation was not perfect. A target range was defined for each studied response, also taking into account their sensitivity to the sum of strains (Coutand *et al.*, 2009).

Strain is a dimensionless variable, but the sum of longitudinal strains is a volumic integral on the stem volume, and was expressed in mm^3 . However for local responses (such as the expression of mecanosensitive genes) standardizing this sum of longitudinal strains by dividing it by the volume of the bent zone was found more appropriate (Coutand *et al.*, 2009). This standardized sum of longitudinal strains is dimensionless and corresponds to the volume-averaged strain. It can thus be expressed in %.

For molecular responses, the standardized sum of longitudinal strains was between 0.5% and 1% (corresponding to predicted *PtaZFP2* induction-factors ranging from 130 to 220 for a single bending, according to previous results obtained with the sum of strains model (Coutand *et al.*, 2009)). For the growth experiments the standardized sum of strains was between 0.4% and 1.4% (corresponding to a predicted maximal diameter growth rate ranging from 0.08 to 0.14 $\text{mm} \cdot \text{day}^{-1}$ for a single bending, according to previous results obtained with the sum of strains model (Coutand *et al.*, 2009)). Plants falling outside these ranges during the experiment were discarded.

Three different types of bending treatments were applied. The first one was a single bending treatment, noted 1B in molecular experiments. The second type of treatment consisted of repeated daily transient bendings with a frequency of one per day, noted *mB-1d* with $m = \{1, 2, 3, 4, 5\}$ in molecular experiments and $m = 9$ in diameter growth studies. The third type of treatment consisted of two successive bendings separated by an increasing interval of n days, noted 2B- nd with $n = \{4, 7, 10, 14\}$ for diameter growth experiments and $n = \{1, 3, 5, 7, 10\}$ in molecular experiments. Comparison between 1B and *mB-1d* was used

to study the possible effects of repetitive bendings (at one per day), while the comparison between various 2B-nd treatments was used to study the possible effects of varying the lag period between successive bendings.

In growth experiments, the diameter growth of each plant was monitored by a linear voltage differential transducer (LVDT, DF/5.0 LIN 3M, Solartron Metrology Ltd) before, during and after the transitory stem bending. The LVDT was set approximately at 10 cm from the stem collar in the middle of an internode. Each LVDT was linked to an Omega bus (Omega, D5131, Voltage +/-5V, Stamford, USA) and to a computer, where a homemade program of data acquisition (LVDT.exe, B Adam, INRA UMR PIAF) recorded average growth every minute. In gene expression experiments, the bent portion of the stem (3 cm long) was collected 30 min after the mechanical stimulation, quickly frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until analysis.

RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNAs were extracted from about 150 mg of bent stems using CTAB extraction buffer as described by Chang *et al.* (1993) and then treated with RNase-free RQ1 DNase (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). RNA was quantified spectrophotometrically and checked by agarose gel electrophoresis. First-strand cDNA was synthesized from 1 µg total RNAs using oligodT and SuperScript III (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) following the protocol of the supplier.

Real-time quantitative RT-PCR experiments

Real-time RT-PCR amplifications were carried out using an iCycler IQ (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) and SYBR green as a fluorescent dye. Each PCR reaction (30 µl) contained: reverse-transcribed cDNA (4 µl of 1:40 dilution of the first cDNA strands), PCR buffer (1X), MgCl₂ (1.66 mM), dNTP mix (200 µM of each), primers (0.3 µM of each), Platinum Taq DNA polymerase (0.5 unit, Invitrogen), and SYBR green I (1/1000, Sigma).

After a heat step at 94 °C for 5 min, PCR cycling conditions were: 40 cycles consisting of denaturing (94 °C, 15 s), annealing (61 °C, 15 s) and elongation (72 °C, 20 s), ending with a final elongation step at 72 °C for 5 min.

PtaZFP2 transcripts were detected by amplifying 287 bp with primers Pe1F 5'-CGTGCGAGTCACAAGAAACC-3' and Pe1R 5'-CACAGAACTCTCTTGCTGCT-3'. A 243 bp *PtaTCH2* cDNA fragment was amplified using the primers PtTCH2F 5'-TGA

TCAAGATGGTGATGGTAATG-3' and PtTCH2R 5'-CGCAAAAACATCAATGGAAA-3'. A 283 bp *PtaTCH4* cDNA fragment was detected with the primers PtTCH4F 5'-GGATGAGATAGATTTTGAATTC-3' and PtTCH4R 5'-ATCAGCATTCATAGACTCGA-3'. *PtaACS6* transcripts were detected by amplifying 243 bp using the primers PtACS6F 5'-GAGATGTTTCATTAGGGAAAGC-3' and PtACS6R 5'-TGGCTTCGAGCAATGAAA GA-3'. *Elongation factor-1 α* (*EF-1 α*) was retained at the reference gene as it had been previously shown to be invariant with mechanical stimulation (Martin *et al.*, 2009). *EF-1 α* transcripts were amplified using the primers EF1F 5'-GACAACTAGGTACTACTGCACTGTC-3' and EF1R 5'-TTGGTGGACCTCTCGATCATG-3'. To ensure the specificity of the primers, all the corresponding PCR products were checked by sequencing (MilleGen company, Labège, France).

Relative quantitative abundance (Qr) of *PtaZFP2*, *PtaTCH2*, *PtaTCH4* and *PtaACS6* transcripts was calculated by comparison with the expression of *EF-1 α* using the delta-delta method mathematical model (Mc Maugh and Lyon, 2003).

$$Qr_{msg/EF-1\alpha} = \frac{2^{(C_{\text{control}} - C_{\text{treated}})_{msg}}}{2^{(C_{\text{control}} - C_{\text{treated}})_{EF-1\alpha}}}$$

Here *msg* represents a mechanosensitive gene, *EF-1 α* is the reference gene, and *C* is the number of cycles needed to reach the threshold detection. Specificity of amplification was confirmed by determining the melt curves for the PCR products at the end of each run and by gel electrophoresis. Real-time PCR amplifications were performed on at least three independent experiments, and every run was carried out in triplicate. A Kruskal-Wallis test was used to determine overall statistical significance. Statistically different groups were obtained with a Newman-Keuls test.

Results

Modification of diameter growth response after repeated bendings

Previous work had shown that a single bending modified poplar stem diameter growth for 5 days on average (Coutand *et al.*, 2009). To check whether or not the plant sensitivity/responsiveness to bending was affected after a single bending, stems were subjected to a loading frequency of one bending per day for 9 days.

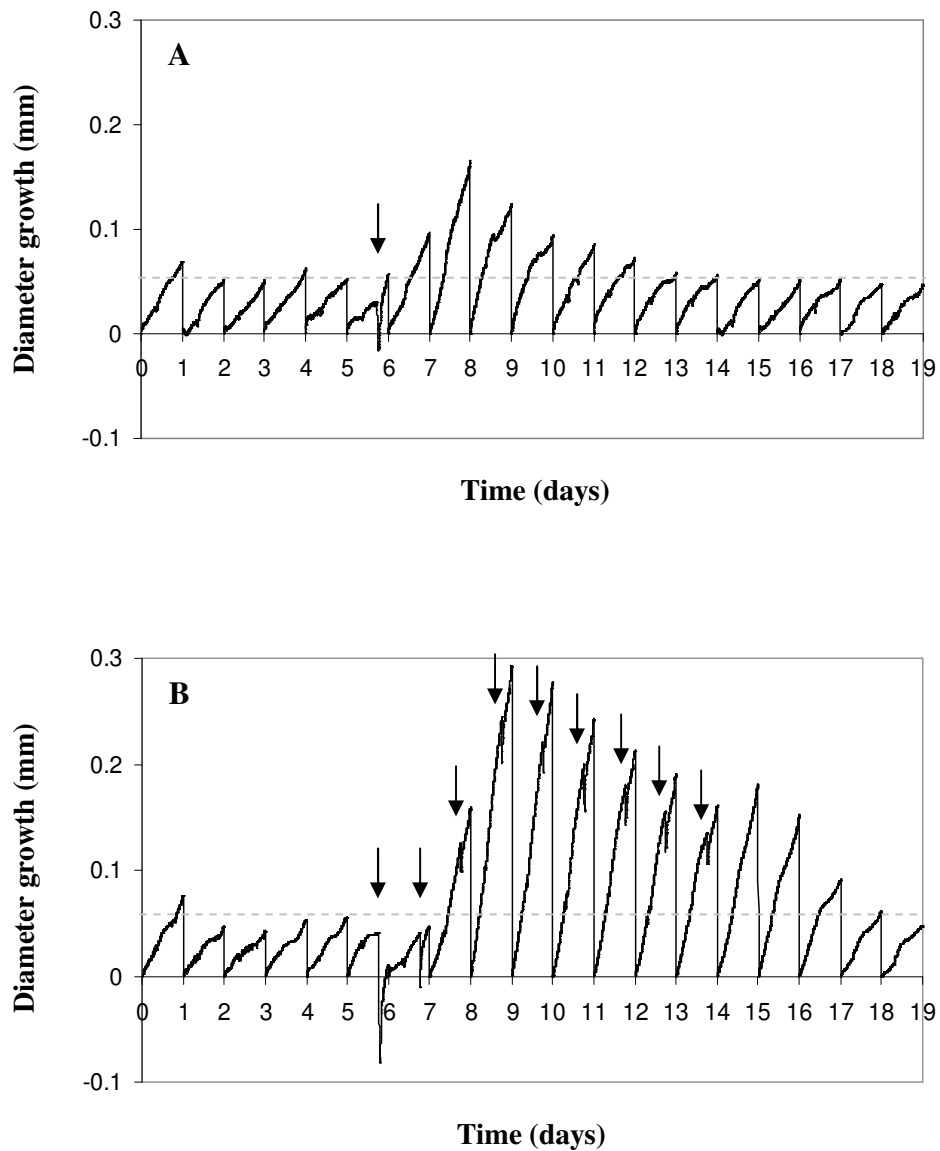


Fig. 2. Representative examples of stem diameter growth recording of one poplar after a single transitory stem bending (A) or after daily repeated bendings for 9 days (B). Diameter growth was measured for 19 days with Linear Voltage Differential Transducers (LVDT). All of the transitory bendings were applied at 5 pm each day (arrows). For better visualization, each day's recording was reset to zero.

Fig. 2 shows two representative recordings of stem diameter growth for plants subjected to one transient bending (Fig. 2A) and a loading frequency of one bending per day for 9 days (i.e. nine successive transient bendings) (Fig. 2B). During the days before bending, poplars reached a stable diameter growth rate (about 0.05 mm per day in these examples). This growth was modified by a single transient bending for 7 days (Fig. 2A), with a peak of growth the second day after bending. The diameter growth then decreased and returned to basal level a few days later. By contrast, when a plant was subjected to one bending per day for 9 days (Fig. 2B), the growth response was affected for at least 12 days after the first bending, and the highest maximal daily diameter growth was observed on the day of the fourth bending.

To analyse the difference in diameter growth responses after one or multiple bendings, we pooled diameter growth recordings of several plants (Fig. 3). The changes in the average daily diameter growth during the experiment are given for plants subjected to the two extreme treatments 1B and 9B-1d (Fig. 3). A maximal daily diameter growth of $0.15 \pm 0.02 \text{ mm.day}^{-1}$ was reached on the second day in the case of a single bending (1B), corresponding to an increase in the diameter growth rate of 0.10 mm.day^{-1} (+300%) compared with the initial growth rate. For plants subjected to nine repeated bendings (9B-1d) a large shift in the time and amplitude of the peak response was found: the peak was approximately 1.7 times higher than for a single bending, and was reached only on the third day after the first bending. Also, after the fourth bending in the 9B-1d treatment, daily diameter growth decreased despite additional bendings. The day after the last bending, the decrease stopped and a small increase in diameter growth was observed (Fig. 3). At the end of the experiment, plant diameter growth rate reached the level observed before the first bending.

To assess the possible interactions between the effects of successive bendings, a theoretical growth response was computed assuming an additive model for repetitive mechanosensing. In this model (noted model 9×1B), we considered that each bending had the same effect (i.e. no interactions between bendings), and that their effects were additive (Fig. 3). The growth response for repeated bendings 9B-1d was intermediate between that of 1B and the additive model 9×1B. The first three repeated bendings strongly increased the stimulation of diameter growth compared with a single bending, and were not statistically different from the additive model, demonstrating that these successive bendings were equally perceived by the plants. However, the effects of the subsequent bendings departed very significantly from the additive model 9×1B, with differences up to $-0.23 \text{ mm.day}^{-1}$. The subsequent bendings thus seemed to have lost their stimulatory effects. This was tested by building a new theoretical model in which additive effects were assumed for the first three

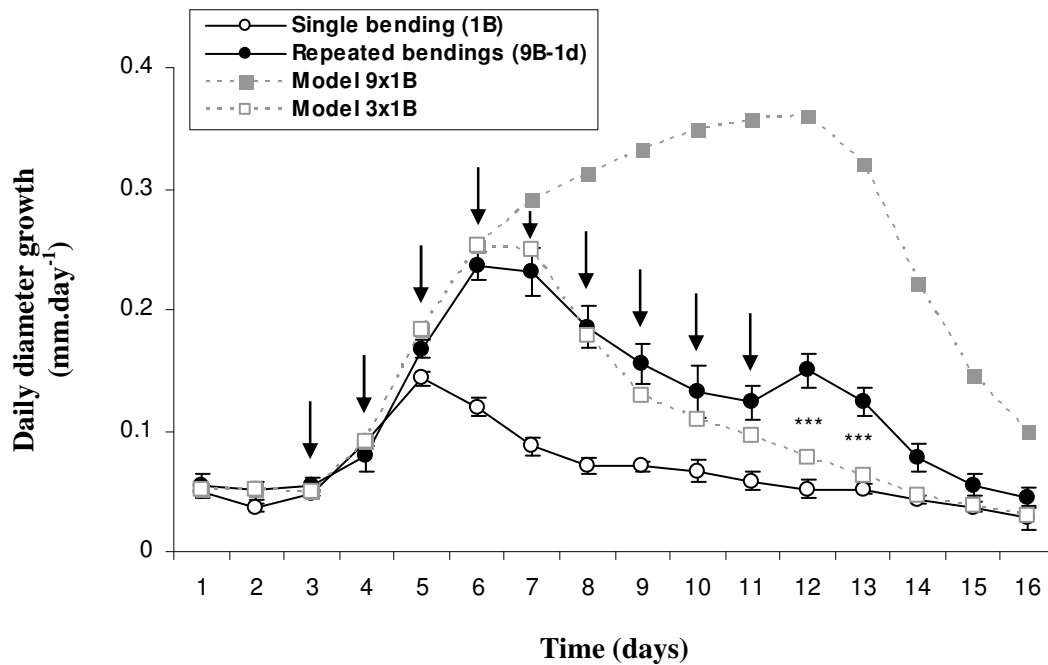


Fig. 3. Comparison of the effect of a single transitory bending or repeated bendings on daily diameter growth of poplars.

Daily diameter growth curves were obtained after one or nine transitory bendings. Arrows indicate the day on which each transitory bending was applied on the stem. Open and closed circles are means \pm SE of ten ($n = 10$) or six ($n = 6$) independent recordings after a single bending or daily repeated bending respectively. Under the hypothesis that the effects of each successive bending were additive, two theoretical models are proposed: model 9 \times 1B (closed squares) and model 3 \times 1B (open squares). These models were obtained using the diameter growth measured on recording 1B and by adding nine times (model 9 \times 1B) or three times (model 3 \times 1B) the effect of a single bending. In model 3 \times 1B, we considered that bendings after the third one had no further effects. Triple asterisks (***) symbolize significant differences between the 9B-1d treatment and 3 \times 1B model at the threshold of 1%.

bendings and no further effects for the following bendings (model 3x1B, Fig. 3). During the repeated bendings no statistically significant differences were found between the experimental data of 9B-1d and the model 3x1B, suggesting that additional bendings after the first three have no further effect on plant growth. However, this model does not account for the whole response. When considering the growth after stopping the mechanical stimulation a very significant +200% increase in diameter growth rate was observed on days 12 and 13, compared with the model 3x1B, suggesting that some inhibition had been released.

These results show that plants responded differently to successive mechanical loadings, and that some desensitization took place.

PtaZFP2, PtaTCH2, PtaTCH4 and PtaACS6 expression after multiple bendings

We investigated the expression of four mechanosensitive genes in response to multiple bendings: *PtaZFP2* gene encoding a Cys2/His2 zinc finger protein, touch-induced genes (*PtaTCH2*, *PtaTCH4*) and *PtaACS6* involved in ethylene biosynthesis. In poplar, previous work showed that the time course of these different genes was transitory and the induction peak was reached rapidly after mechanical solicitations (Martin *et al.*, 2009). Thus expression measurements were carried out 30 minutes after each bending.

A single transient bending (1B) led to a 210- to 430-fold induction of *PtaZFP2* (average 320-fold) (Fig. 4A, treatment 1B). As expected from Coutand *et al.* (2009), this variation of *PtaZFP2* transcripts abundance was due to the different levels of mechanical loadings with standardized sum of applied strains ranging from 0.6% to 1%. The highest level of sum of strains (1%) corresponded to the highest relative transcripts abundance (430-fold). Carrying out an additional transitory bending every 24 h for 2–5 days induced only an average 35-fold increase in *PtaZFP2* transcripts accumulation (Fig. 4A, treatments 2B-1d to 5B-1d). The differences between the treatments were no longer related to variations in the sum of strain stimulus applied to the plants.

As for *PtaZFP2*, a single transitory bending induced an over-expression of *PtaTCH2*, *PtaTCH4* and *PtaACS6* genes (Fig. 4B,C,D, treatment 1B). This induction was 574-fold for *PtaTCH4* and 15-fold for *PtaACS6*. Again, the highest level of longitudinal strains (1%) induced the highest increase in *PtaTCH4* mRNA (741-fold) and *PtaACS6* mRNA (17-fold). Whatever the number, additional bendings led to a lower induction with a mean 200-fold for *PtaTCH4* and 3.5 fold for *PtaASC6* compared with the basal level observed in non-bent plants (Fig. 4B,C, treatments 2B-1d to 5B-1d). Despite different global induction levels, *PtaTCH4*

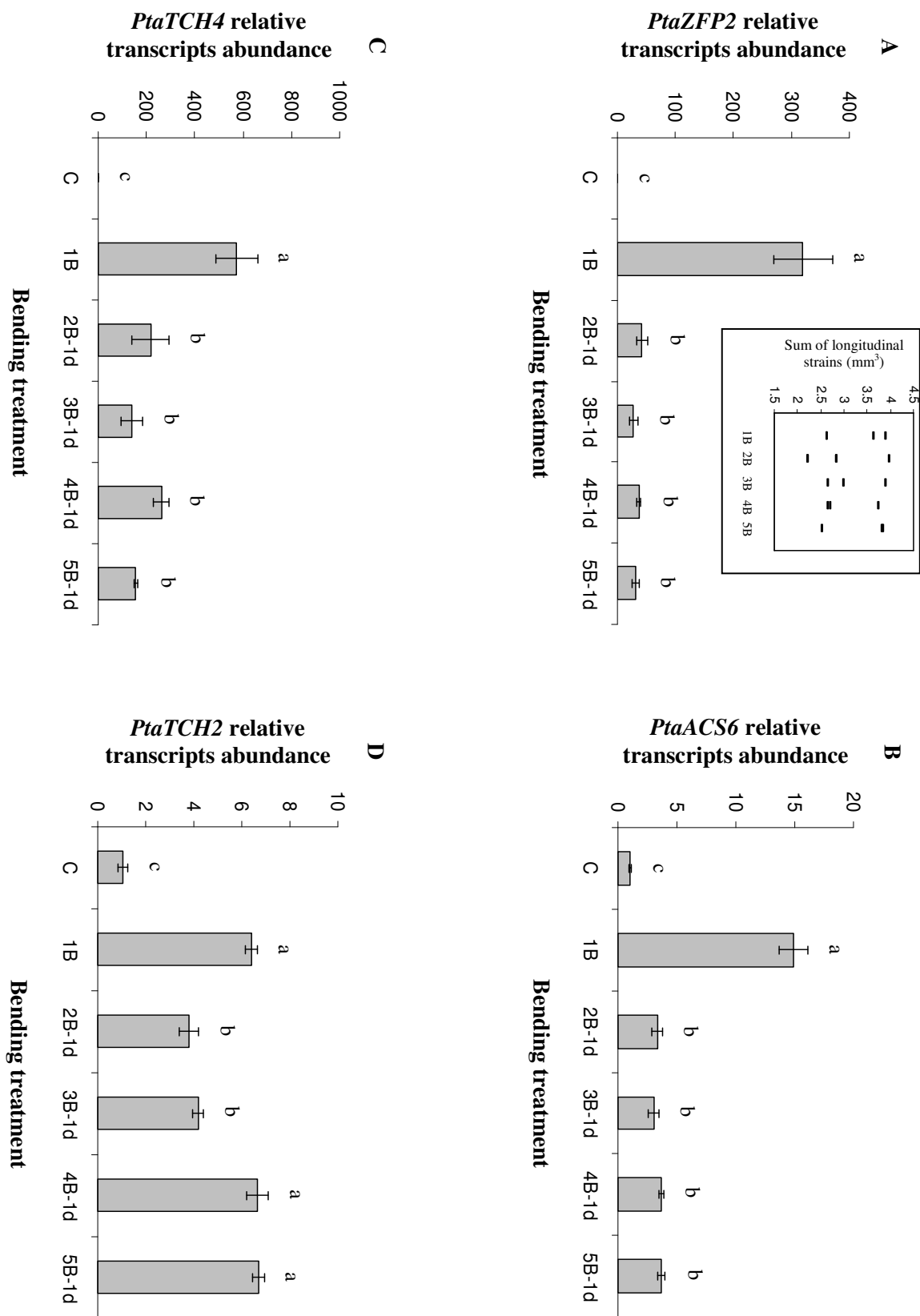


Fig. 4. Relative transcript abundance of *PtaZFP2* (A), *PtaACS6* (B) *PtaTCH4* (C) and *PtaTCH2* (D) genes after repeated bendings.

Total RNAs were extracted from stems of non-bent plants (C) and from bent stems collected 30 minutes after a single bending (1B) or after the last bending (mB) at a rate of one per day (2B-1d, 3B-1d, 4B-1d and 5B-1d). Relative transcript abundance was determined by real time PCR and corresponds to the means \pm SE of four independent experiments. Significant differences ($P < 0.05$) of responses after different numbers of applied bendings are indicated by different letters.

and *PtaACS6* expression profiles after repeated bendings displayed similarity with that observed with *PtaZFP2*.

For *PtaTCH2*, a single transitory bending induced only a sixfold increase in its transcript accumulation (Fig 4D, treatment 1B). A statistically significant *PtaTCH2* expression decrease was observed after the second and third bendings. However, contrary to the other three genes, *PtaTCH2* relative transcript abundance rose again after the fourth and fifth bendings to reach the level observed after the first bending (Fig. 4D).

In conclusion, once plants had been subjected to a primary bending, they responded differently to additional bendings at a molecular level. In particular, the expression level of three of the four mechanosensitive genes tested immediately after the second bending was 1.5 to 8 times lower than after a single bending.

Effects of time interval between two successive bendings on diameter growth response

To evaluate the time necessary for the plant to recover its maximal sensitivity/responsiveness, bendings were applied at decreasing frequencies. For this experiment, a population of plants was subjected to two transient bendings 4 to 14 days apart. As described previously, we controlled the applied level of strains for each plant.

Fig. 5 shows a representative recording of stem diameter growth in a plant subjected to two bendings 10 days apart. In this case, the two bendings induced a similar diameter growth response, whereas the growth responses were different with two bendings 24 h apart (Fig. 2B). Comparison between the growth responses induced by the two separate bendings with intermediate lag periods was not straightforward. When the period between the two stimulations was less than 6–7 days, diameter growth response induced by the first bending was not achieved. Assuming an additive model of mechanoperception, the specific response due to the considered bending was obtained by subtracting the diameter growth observed during the day before this bending was applied from the maximal daily diameter growth observed after the considered bending application. To compare the effects of the different lag period between successive bendings, this calculation mode was applied for each experiment (Fig. 6). For the four bending frequencies tested, no statistically significant difference was observed for the diameter growth responses induced by the first bending, indicating the repeatability of the treatment. As shown in Figure 6, when a second bending was applied 4 or 7 days after the first one, the induction of diameter growth was less marked than in the case of

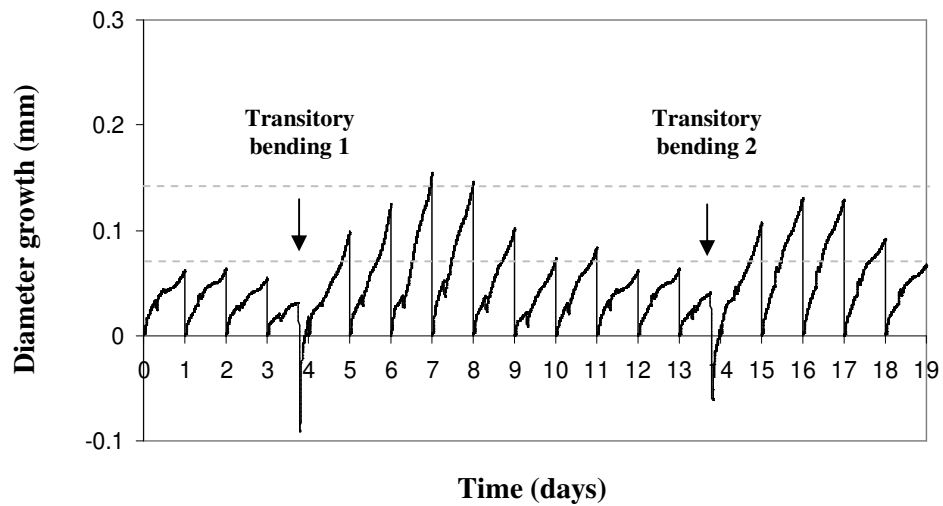


Fig. 5. Representative example of stem diameter growth recording of one plant after two transitory stem bendings applied 10 days apart. Diameter growth was measured for 19 days with linear voltage differential transducers (LVDT). The two transient bendings were applied at 5 pm (arrows). For better visualization, each day's recording was reset to zero.

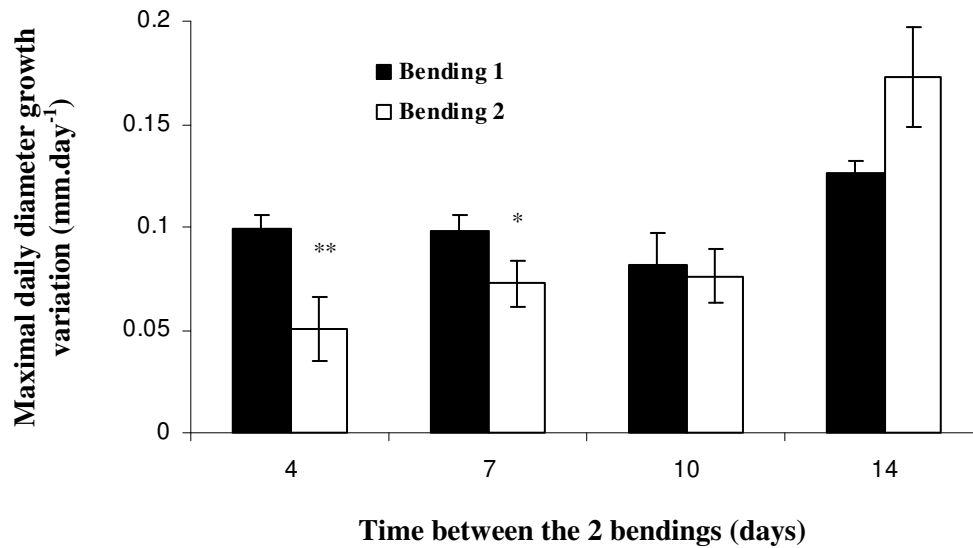


Fig. 6. Effect of the time elapsed between two separate transitory bendings on diameter growth responses of poplars.

Maximal daily diameter growth variations were obtained by subtracting diameter growth observed during the day when bending was applied with the maximal daily diameter growth observed after bending. Results are means \pm SE of three ($n = 3$) to seven ($n = 7$) independent recordings. Asterisks (*) symbolise significant differences at the threshold of 10%. Double asterisks (**) symbolize significant differences at the threshold of 5%.

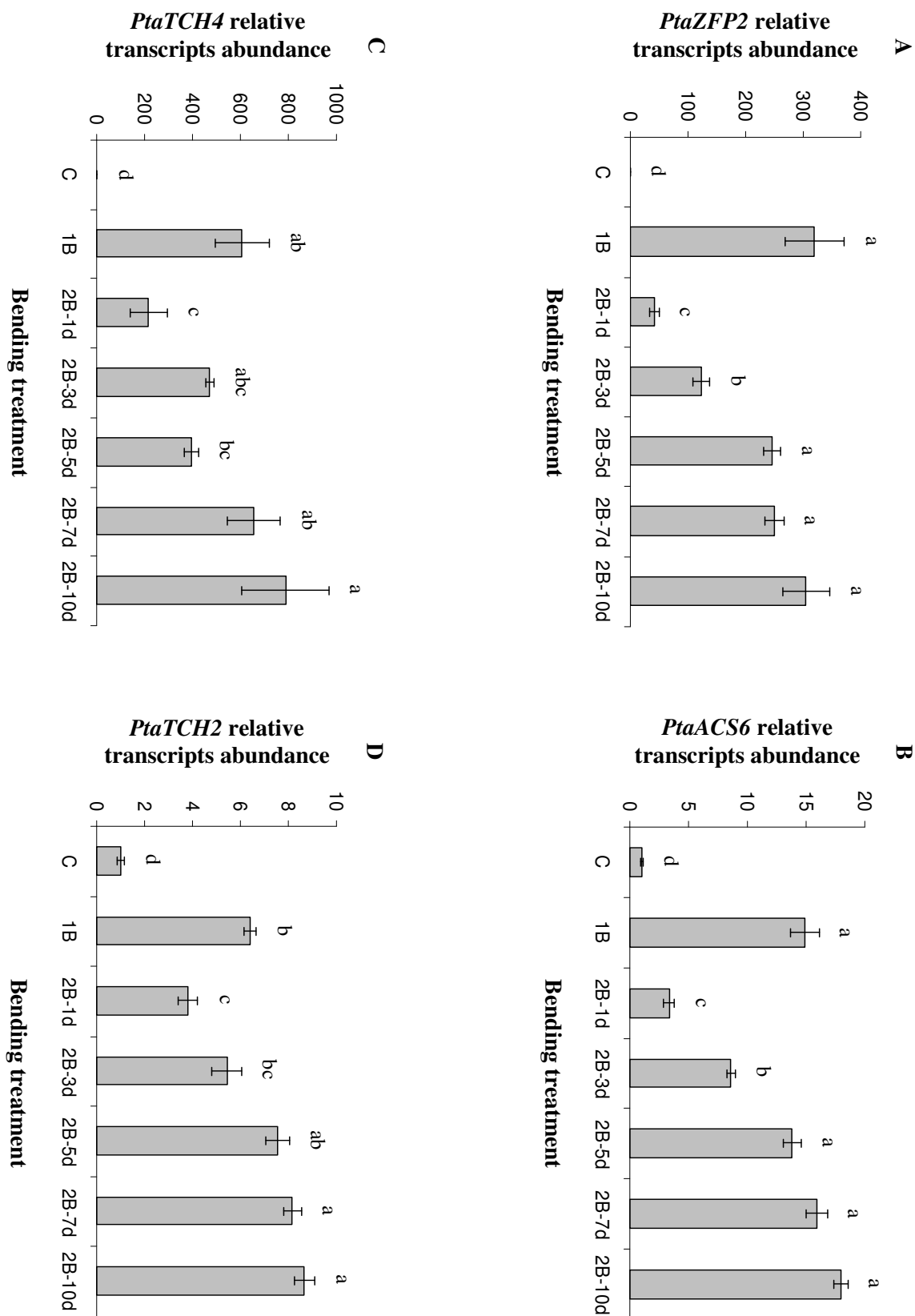


Fig. 7. Effect of the time elapsed between two separate transitory bendings on molecular responses of poplars.

Total RNAs were extracted from stems of non-bent plants (C) and from bent stems harvested 30 minutes after a single bending (1B) or after the second bending (2B) applied 1, 3, 5, 7 or 10 days after the first one (2B-1d, 2B-3d, 2B-5d, 2B-7d, 2B-10d respectively). Relative transcript abundance of *PtaZFP2* (A), *PtaACS6* (B), *PtaTCH4* (C) and *PtaTCH2* (D) was determined by real time PCR and corresponds to the means \pm SE of four independent experiments. Significant differences ($P < 0.05$) between responses obtained with different times elapsed between the two applied bendings are indicated by different letters.

one single bending. On the contrary, no statistically significant difference from the effect of the first bending was observed when the two bendings were 10 or 14 days apart (Fig. 6). These results indicate that plants needed at least 7 days between two mechanical loadings to recover their initial diameter growth response and thus their initial mechanosensing sensitivity.

Transcripts expression recovery of the genes PtaZFP2, PtaACS6, PtaTCH2 and PtaTCH4 after two bendings

We have shown that repeated bendings at a rate of one per day induced less transcript accumulation of the four mechanosensitive genes tested than a single transient bending. To measure the time for plant sensitivity/responsiveness recovery at the molecular level, we investigated the expression of these genes after the application of the second transient bending, varying the time elapsed between the two applied bendings (Fig. 7).

In our conditions, a single transitory bending led to an average 320-fold induction of *PtaZFP2* expression (Figs. 4A, 7A, treatment 1B). A second transitory bending applied 24 h later (treatment 2B-1d) induced a 10-fold lowering of *PtaZFP2* transcript accumulation relative to the first bending. Applying the second bending 3 days after the first one (treatment 2B-3d), the mRNA level was only 3 times lower than after a single bending. When the two bendings were 5 days or longer apart, no more statistically significant difference was observed in *PtaZFP2* transcript accumulation after one or two bendings (Fig. 7A, treatments 2B-5d, 2B-7d, 2B-10d). In the limited range of sum of strains investigated, the differences between the treatments were no longer related to variations in the sum of strains stimulus applied to the plants.

As for *PtaZFP2*, the three other genes studied (*PtaACS6*, *PtaTCH2* and *PtaTCH4*) needed several days to recover a level of transcript induction equivalent to that observed after a single bending (Fig. 7B,C,D, treatment 1B). Despite differences in *PtaZFP2* and *PtaACS6* relative mRNA abundance, their expression profiles were similar (Fig. 7A,B), revealing similar kinetic characteristics. For *PtaTCH4*, no statistically significant differences were observed when the two bendings were 3 days apart, but its induction level seemed to have totally recovered only when the two stimulations were more than 7 days apart (Fig. 7C). Concerning *PtaTCH2*, 3 days between two bendings were necessary to recover the same level of induction (Fig. 7D).

When the time interval between two successive bending was long enough (5 days on average), the second bending induced a similar transcript accumulation of the various genes to that observed after a single one.

Discussion

Mechanical loadings have been shown to reduce longitudinal growth and stimulate radial growth in most species (Jaffe and Forbes, 1993; Braam, 2005), including poplars (Coutand *et al.*, 2009). This was confirmed in this study, which demonstrates that a single transitory bending induces a stimulation of stem diameter growth lasting at least 4 days (Fig. 2A). However, the effects of a bending on growth depend on the prior mechanical history of the plant. Repeated daily bendings had almost additive effects for 3 days until the plant became desensitized or even inhibited by successive bendings (Fig. 3). Desensitization of growth responses during successive bendings have also been reported by Telewski and Pruyn (1998) in a 3-week experiment on *U. americana*. For the secondary growth response they found no differences between treatments ranging from five bendings a day to 80 bendings a day, for 3 weeks, suggesting a complete loss of additive effects in their experiment. With such higher frequencies of bending, plants may thus acclimate their sensitivity more quickly, and the time for saturation with repeated bending (2 days in our experiment) may actually be frequency-dependent. A similar rapid acclimation to mechanical loading was already observed for bone growth (Moullia *et al.*, 2006). During an animal's skeletal growth and development, skeletal mass and architecture are continuously adjusted to a changing mechanical environment. Turner (1998) described three rules governing bone acclimation (called adaptation in their work) to mechanical loadings: (i) acclimation is driven by dynamic loading, (ii) only a short duration of mechanical loading is necessary to initiate an acclimation response and (iii) bone cells acclimate to a customary, or chronic, mechanical loading environment, making them less responsive to routine loading signals (Turner, 1998; Schriefer *et al.*, 2005). According to our results, at least the last two rules seem also to apply to plant growth response.

This comparison between our results and those of Telewski and Pruyn, (1998) may bear more ecological significance when compared with wind loads in nature. During their growth, plants are continuously subjected to wind over a broad spectrum of eddy size and frequency (de Langre, 2008). However, the major distortions (and hence strains) of trees may lay

typically in the range of 1–5 Hz, corresponding to 60–300 bendings per minute (Rodriguez *et al.*, 2008). However, plants also experience meteorological alternances between windy and non-windy days. Thus day-scale acclimation of sensitivity to successive bending periods as reported here may allow plants to acclimate to the type of wind weather they experience in their specific environment. Fully assessing this hypothesis would require additional studies, but our growth experiments demonstrate that plant acclimation during long-term experiments (Telewski and Pruyn, 1998) occurs at a scale of days.

Such an acclimation process was also observed at a molecular level. A second bending applied 24 h after the first one led to a markedly decreased induction of the all four primary mechanosensitive genes studied. These results corroborate the rapidity of plant acclimation observed in the diameter growth study (Fig. 3). However, differences in kinetics of gene expression and integrated growth responses were observed. Whereas an acclimation process was clearly observed after the second bending for gene expression, this effect appeared gradually for growth response and was only obvious for the fourth bending. Several hypotheses can be proposed to explain these differences. First, we cannot exclude the possibility, however unlikely, that two different perception systems are involved in the molecular responses studied, and in the growth response. Another possibility is that the variation in sensitivity of the diameter growth response is not high and rapid enough to be observed during the second and the third bending in our experimental conditions. When the two bendings were 4 days apart, plant diameter growth responses were indeed different (Fig. 6). By contrast, the underlying mechanisms regulating gene expression are faster. This was probably due in part to the fact that the genes studied were transiently expressed (Arteca and Arteca, 1999; Braam and Davis, 1990; Martin *et al.*, 2009) and repressed before the second bending. In contrast, the growth response could involve long-lived molecular actors which are potentially more slowly regulated. The data from this work also suggest that the four mechanosensitive genes used in this study are not directly implicated in the process of diameter growth. However, as their regulation is earlier than diameter growth response, these genes could be involved in an acclimation process that takes place gradually until the fourth bending and that inhibits (or at least reduces) the diameter growth response observed after the fourth bending.

Molecular response to four (unquantified) successive touch stimulations at a rate of one per hour was previously reported by Arteca and Arteca in 1999 on 3-week old *A. thaliana*. They found a maximal stimulation in *AtACS6* expression after one touch stimulation, with a

clear reduction in its expression after the second touch, and a possible gradual reduction in touch-induced *AtACS6* expression with additional stimulations. This is consistent with our finding that successive bendings are inhibitory for *PtaACS6* expression in poplar. However, their interpretation of the reported gradual reduction in *AtACS6* expression was not straightforward. In their study, the *AtACS6* levels were not quantified, and the touch stimulations were not controlled, so that changes over time in the amounts of mechanical stimulations are likely. In our study, although the time interval between two treatments was longer (24 h), *PtaZFP2*, *PtaACS6*, *PtaTCH2* and *PtaTCH4* expressions were also significantly reduced by successive controlled bendings, demonstrating quantitative molecular acclimation to transient bendings. As this response was observed for all four early-responsive genes tested, these results suggest that the mechanism leading to cellular acclimation to bending occurs very early in the signalling pathway.

Rapid molecular acclimation is not limited to mechanical stress and has also been observed for cold stress. In *A. thaliana*, cold acclimation involves action of the CBF cold-response pathway (Thomashow, 2001). When plants were moved back and forth between warm and cold temperatures at 90-minute intervals for four rounds, the levels of *CBF* transcripts obtained upon cold shock were significantly diminished (Zarka *et al.*, 2003)

Since plant responses were lower after a second bending than after a single one, the results indicate a partial desensitization to mechanical loadings. In this study, an interval of 7–10 days between bendings was necessary to recover a diameter growth response similar to that observed after the first mechanical loading (Fig. 6), whereas only 5 days were needed to recover a similar transcript accumulation after two bendings for the four genes tested (Fig. 7). When the time interval was less than 5 days, gene expression level was positively correlated to the number of days elapsed between the two bendings (Fig. 7) suggesting a gradual recovery of maximal sensitivity/responsiveness. These observations confirmed that a first exposure to mechanical loading induced a partial desensitization of plants. In *A. thaliana*, by following *CBF* transcript accumulation, Zarka *et al.* (2003) demonstrated that the cold-sensing mechanism became desensitized at 4 °C and that the gradual resensitization process requires between 8 h and 24 h at warm temperature. Thus resensitization takes at least 5 times longer for bending than for cold stress.

At this time, the nature of the putative desensitization mechanism is unknown. Two hypotheses can be proposed: either perception capacities or early responses may be modified. Concerning mechanoperception capacities, recent studies have identified mechanosensitive

channels in *A. thaliana* (Haswell *et al.*, 2008), similar to *Escherichia coli* MscS mechanosensitive channels (Hamill, 2006). The involvement of such proteins in plant response to repeated bendings or to wind has not yet been demonstrated. Nevertheless, mechanosensitive channels are known to display a relaxation time for recovery of the full response. However, this inhibition has been shown to last only few seconds in *Escherichia coli* (Hamill, 2006). Among the first cellular changes upon mechanostimulation are also modifications of plant plasma membrane fluidity (Mathieu *et al.*, 1995) and remodelling of the cytoskeleton (Ikushima and Shimmen, 2005). These two elements may contribute to the acclimation of the channels mechanosensitivity (Moullia and Fournier, 2009), since the current model explaining sensing of a mechanical signal involves a cytoskeleton–plasma membrane–cell wall (CPMCW) interface (Telewski, 2006). Another explanation for perception modifications could be that only the new cells produced by cambium after bending are sensitive to the second treatment exposure. It will be interesting to test this suggestion by comparing the localization of the mechanosensitive gene expression after one or two bendings (although this process might be too slow to account for the results of Arteca and Arteca, 1999).

Concerning the regulation of early responses, in cold acclimation, Zarka *et al.* (2003) raised the possibility that desensitization may be affected by a cold “memory” component, and suggested that this memory might be related to the altered peak levels and duration of calcium influx observed by Knight *et al.* (1996) upon cold acclimation. Increased intracellular calcium is also a rapid cellular response after mechanical loading (Knight *et al.*, 1992). Thus calcium could be an actor of mechanical “memory”.

When studying mechanosensitive gene expression, another striking result is that the desensitization to mechanical stimuli lasted from 3 to 5 days (Fig. 7). Such capacity of long-term “memory” or “stress imprint” has already been observed in response to various other abiotic stresses (see Bruce *et al.*, 2007 for a review) and has also been found for mechanical stimuli (Desbiez *et al.*, 1984). To explain such long-term information storage, Bruce *et al.* (2007) suggest that epigenetic changes can occur. However, nothing is known about the putative role of epigenetic modifications during plant responses to mechanical loading.

In conclusion, significant changes in the sensitivity of plant responses to repetitive bending are observed over days. This acclimation process appears to be faster for primary molecular responses than for diameter growth. This provides a basis for a more mechanistic approach to response sensitivity to mechanical loadings such as wind.

Acknowledgements

This work is part of the Senzo project supported by ANR-BLAN NT09_627176. The authors are grateful to Christelle Boisselet for her help with plant production and preparation of nutrient solutions and to Sylvaine Labernia for her help in molecular experiments. We also thank Stephane Ploquin, Boris Adam, Norbert Frizot and Christophe Serre for their technical assistance.

References

- Apel K, Hirt H.** 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 373-399.
- Arteca JM, Arteca RN.** 1999. A multi-responsive gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase (ACS6) in mature Arabidopsis leaves. *Plant Molecular Biology* **39**, 209-219.
- Botella JR, Arteca RN, Frangos JA.** 1995. A Mechanical Strain-Induced 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Synthase Gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 1595-1598.
- Boyer N.** 1967. Modification de la croissance de la tige de bryone (*Bryonia dioica*) à la suite d'irritations tactiles. *Compte Rendu de l'Académie des Sciences de Paris*. **267**, 2114-2117.
- Braam J, Davis RW.** 1990. Rain-induced, wind-induced, and touch-induced expression of calmodulin and calmodulin-related genes in Arabidopsis. *Cell* **60**, 357-364.
- Braam J.** 1992. Regulated expression of the calmodulin-related Tch genes in cultured Arabidopsis cells - induction by calcium and heat-shock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 3213-3216.
- Braam J.** 2005. In touch: plant responses to mechanical stimuli. *New Phytologist* **165**, 373-389.
- Bruce TJA, Matthes MC, Napier JA, Pickett JA.** 2007. Stressful "memories" of plants: Evidence and possible mechanisms. *Plant Science* **173**, 603-608.
- Chang SJ, Puryear J, Cairney J.** 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter* **11**, 113-116.
- Coutand C, Moulia B.** 2000. Biomechanical study of the effect of a controlled bending on tomato stem elongation: local strain sensing and spatial integration of the signal. *Journal of Experimental Botany* **51**, 1825-1842.
- Coutand C, Dupraz C, Jaouen G, Ploquin S, Adam B.** 2008. Mechanical stimuli regulate the allocation of biomass in trees: Demonstration with young *Prunus avium* trees. *Annals of Botany* **101**, 1421-1432.
- Coutand C, Martin L, Leblanc-Fournier N, Decourteix M, Julien JL, Moulia B.** 2009. Strain mechanosensing quantitatively controls diameter growth and *PtaZFP2* gene expression in poplar. *Plant Physiology* **151**, 1-10.

- de Langre E.** 2008. Effects of wind on plants. *Annual Review of Fluid Mechanics* **40**, 141-168.
- Desbiez OM, Kergosien Y, Champagnat P, Thellier M.** 1984. Memorization and delayed expression of regulatory messages in plants. *Planta* **160**, 392-399.
- Hamant O, Heisler MG, Jonsson H, Krupinski P, Uyttewaal M, Bokov P, Corson F, Sahlin P, Boudaoud A, Meyerowitz EM, Couder Y, Traas J.** 2008. Developmental patterning by mechanical signals in Arabidopsis. *Science* **322**, 1650-1655.
- Hamill OP.** 2006. Twenty odd years of stretch-sensitive channels. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* **453**, 333-351.
- Haswell ES, Peyronnet R, Barbier-Brygoo H, Meyerowitz EM, Frachisse JM.** 2008. Two MscS homologs provide mechanosensitive channel activities in the Arabidopsis root. *Current Biology* **18**, 730-734.
- Ikushima T, Shimmen T.** 2005. Mechano-sensitive orientation of cortical microtubules during gravitropism in azuki bean epicotyls. *Journal of Plant Research* **118**, 19-26.
- Ingber DE.** 2005. Mechanical control of tissue growth: Function follows form. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 11571-11572.
- Jaffe MJ.** 1973. Thigmomorphogenesis. The response of plant growth and development to mechanical stimulation. *Planta* **114**, 143-157.
- Jaffe MJ, Forbes S.** 1993. Thigmomorphogenesis - the effect of mechanical perturbation on plants. *Plant Growth Regulation* **12**, 313-324.
- Jakab G, Ton J, Flors V, Zimmerli L, Metraux JP, Mauch-Mani B.** 2005. Enhancing Arabidopsis salt and drought stress tolerance by chemical priming for its abscisic acid responses. *Plant Physiology* **139**, 267-274.
- Knight MR, Smith SM, Trewavas AJ.** 1992. Wind-induced plant motion immediately increases cytosolic calcium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 4967-4971.
- Knight H, Trewavas AJ, Knight MR.** 1996. Cold calcium signaling in Arabidopsis involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. *Plant Cell* **8**, 489-503.
- Knight H, Brandt S, Knight MR.** 1998. A history of stress alters drought calcium signalling pathways in Arabidopsis. *Plant Journal* **16**, 681-687.

- Kreps JA, Wu YJ, Chang HS, Zhu T, Wang X, Harper JF.** 2002. Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiology* **130**, 2129-2141.
- Leblanc-Fournier N, Coutand C, Crouzet J, Brunel N, Lenne C, Moulia B, Julien JL.** 2008. Jr-ZFP2, encoding a Cys2/His2-type transcription factor, is involved in the early stages of the mechano-perception pathway and specifically expressed in mechanically stimulated tissues in woody plants. *Plant Cell and Environment* **31**, 715-726.
- Lee D, Polisensky DH, Braam J.** 2005. Genome-wide identification of touch- and darkness-regulated Arabidopsis genes: a focus on calmodulin-like and XTH genes. *New Phytologist* **165**, 429-444.
- Martin L, Leblanc-Fournier N, Azri W, Lenne C, Henry C, Coutand C, Julien JL.** 2009. Characterization and expression analysis under bending and other abiotic factors of *PtaZFP2*, a poplar gene encoding a Cys2/His2 zinc finger protein. *Tree Physiology* **29**, 125-136.
- Mathieu C, Motta C, Hartmann MA, Thonat C, Boyer N.** 1995. Changes in plasma-membrane fluidity of *Bryonia dioica* internodes during thigmomorphogenesis. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1235**, 249-255.
- McMaugh SJ, Lyon BR.** 2003. Real-time quantitative RT-PCR assay of gene expression in plant roots during fungal pathogenesis. *Biotechniques* **34**, 982-986.
- Morizet J, Mingeau M.** 1976. Effect of environment on water-uptake, as studied on beheaded exuding tomato .1. Role of Nutrients. *Annales Agronomiques* **27**, 183-205.
- Moulia B, Coutand C, Lenne C.** 2006. Posture control and skeletal mechanical acclimation in terrestrial plants: Implications for mechanical modeling of plant architecture. *American Journal of Botany* **93**, 1477-1489.
- Moulia B, Fournier M.** 2009. The power and control of movements in plants: a plant biomechanics and system biology view (Darwin series invited review). *Journal of Experimental Botany* **60**, 461-486.
- Murashige T, Skoog F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-492.
- Potters G, Pasternak TP, Guisez Y, Palme KJ, Jansen MAK.** 2007. Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends in Plant Science* **12**, 98-105.
- Rodriguez M, de Langre E, Moulia B.** 2008. A scaling law for the effects of architecture and allometry on tree vibration modes suggests a biological tuning to modal compartmentalization. *American Journal of Botany* **95**, 1523-1537.

- Schriefer JL, Warden SJ, Saxon LK, Robling AG, Turner CH.** 2005. Cellular accommodation and the response of bone to mechanical loading. *Journal of Biomechanics* **38**, 1838-1845.
- Sistrunk ML, Antosiewicz DM, Purugganan MM, Braam J.** 1994. Arabidopsis Tch3 encodes a novel Ca^{2+} binding-protein and shows environmentally-induced and tissue-specific regulation. *Plant Cell* **6**, 1553-1565.
- Telewski FW, Pruyn ML.** 1998. Thigmomorphogenesis: a dose response to flexing in *Ulmus americana* seedlings. *Tree Physiology* **18**, 65-68.
- Telewski FW.** 2006. A unified hypothesis of mechanoperception in plants. *American Journal of Botany* **93**, 1466-1476.
- Thomashow MF.** 2001. So what's new in the field of plant cold acclimation? Lots! *Plant Physiology* **125**, 89-93.
- Turner CH.** 1998. Three rules for bone adaptation to mechanical stimuli. *Bone* **23**, 399-407.
- Xu W, Purugganan MM, Polisensky DH, Antosiewicz DM, Fry SC, Braam J.** 1995. Arabidopsis Tch4, regulated by hormones and the environment, encodes a Xyloglucan Endotransglycosylase. *Plant Cell* **7**, 1555-1567.
- Zarka DG, Vogel JT, Cook D, Thomashow MF.** 2003. Cold induction of Arabidopsis CBF genes involves multiple ICE (Inducer of CBF expression) promoter elements and a cold-regulatory circuit that is desensitized by low temperature. *Plant Physiology* **133**, 910-918.

Chapitre 4

*Production et analyse de
peupliers transgéniques
présentant une surexpression
ou une inhibition de
l'expression de $PtaZFP2$*

I- Introduction

Au cours des expériences présentées dans les trois premiers chapitres, nous avons mis en évidence que le gène *PtaZFP2* présentait une expression rapide, transitoire et cantonnée à la zone fléchie. Nous avons également montré que son expression était corrélée à la somme des déformations longitudinales subies par les tiges. Enfin, nous avons observé une acclimatation de la réponse moléculaire des plantes, caractérisée notamment par une diminution du niveau d'expression de *PtaZFP2* suite à l'application de flexions transitoires successives. Des questions se posent alors sur son rôle dans la réponse de croissance des plantes suite à une sollicitation mécanique, mais aussi sur sa place dans la cascade de transduction du signal.

Pour tenter de répondre à ces questions, nous avons fait le choix de produire des plantes transgéniques présentant une modification (surexpression ou inhibition) de l'expression de *PtaZFP2*.

1.1- Les constructions permettant la surexpression

Des travaux antérieurs, portant sur l'étude du rôle de protéines à deux doigts de zinc de type Cys2/His2 (C2H2-ZFP) chez *Arabidopsis thaliana*, ont montré que l'obtention de transformants surexprimant *AZF2* et *STZ* sous le contrôle d'un promoteur constitutif CaMV 35S était difficile (Sakamoto *et al.*, 2004). De plus, dans les rares transformants obtenus, hormis pour deux plantes ayant intégré *STZ*, l'expression des gènes n'était pas augmentée, suggérant ainsi que la surexpression de ce type de gène induit d'importants problèmes de développement et de croissance des plantes. Afin d'éviter ces problèmes de létalité causés par la surexpression de certains transgènes lors de la régénération des jeunes plantes et de pouvoir contrôler de manière précise le niveau et la durée d'expression du gène introduit, nous avons utilisé un vecteur contenant un promoteur inducible par une hormone animale, le β -œstradiol. Nous avons également fait le choix d'introduire soit la séquence codante de *PtaZFP2*, soit celle d'un homologue chez le noyer *JrZFP2* (Leblanc-Fournier *et al.*, 2008). Cette deuxième construction a été réalisée afin de palier d'éventuels phénomènes de silencing du gène résidant, observés dans certains cas de surexpression sous contrôle d'un promoteur 35S (Matzke et Matzke, 1995 ; Elmayan et Vaucheret, 1996).

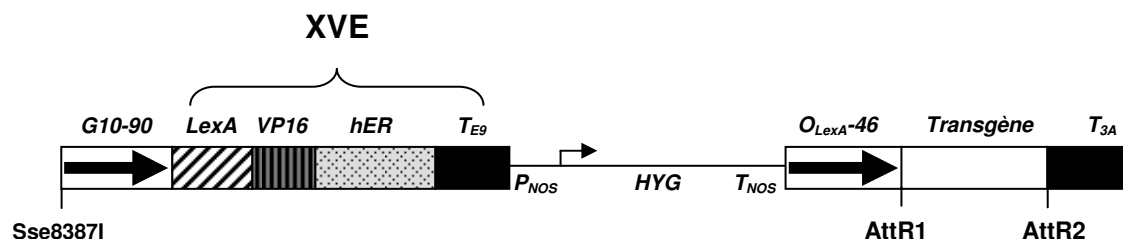


Figure 18 : Schéma de la cassette de surexpression du vecteur PMDC7 (d'après Zuo *et al.*, 2000).

Le promoteur constitutif *G10-90* contrôle l'expression de la protéine de fusion XVE. Cette protéine est formée du domaine de liaison à l'ADN de *LexA* (résidus 1-87), du domaine d'activation de la transcription de *VP16* (résidus 403-479), de la région régulatrice du récepteur humain d'œstrogènes *hER* (résidus 282-595) et d'une séquence polyA *T_{E9}*. La cassette de surexpression comprend également une séquence *P_{NOS}* correspondant au promoteur de la nopaline synthase, un gène de résistance à l'hygromycine (*HYG*) et une séquence *T_{NOS}* poly adénylée. Le transgène est entouré des sites *AttR1* et *AttR2* permettant la recombinaison homologue à l'aide du système GATEWAY, précédé d'un promoteur *O_{LexA-46}* et suivi d'une séquence *T_{3A}* poly-adénylée.

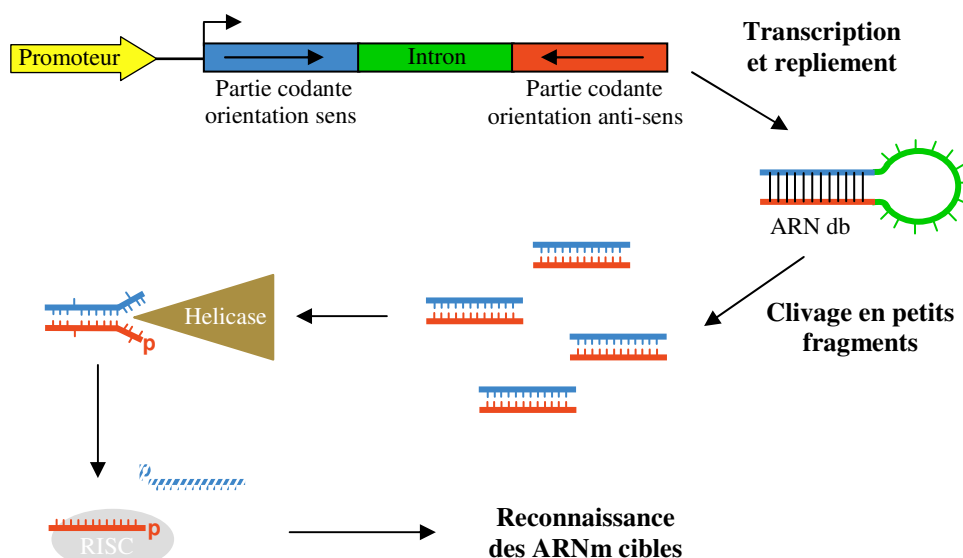


Figure 19 : Principe de la production des petits ARNs doubles brins à l'aide des vecteurs utilisés.

La transcription d'un transgène formé d'une partie de la séquence codante du gène d'intérêt introduite 2 fois, en orientation opposée et séparée par un intron, permet la formation d'ARNs doubles brins qui seront clivés en fragments de quelques nucléotides. Ces petits nucléotides, une fois sous forme simple brin, vont permettre le recrutement d'un complexe protéique particulier induisant, soit la dégradation des ARNs cibles, soit un blocage de la traduction (voir texte pour plus de détails).

Le vecteur utilisé pour ces transformations est le vecteur PMDC7 (Curtis et Grossniklaus, 2003) qui dérive du vecteur PER8 (Zuo *et al.*, 2000). Ce vecteur comprend un promoteur constitutif P_{G10-90} qui induit l'expression d'un facteur de transcription chimérique XVE qui est activé en présence de β -œstradiol (figure 18). Une fois activé, ce dernier agit sur un promoteur inductible O_{LexA}-46 contrôlant l'expression du gène d'intérêt. Le niveau d'expression de ce dernier dépend de la dose d'hormone introduite dans le milieu de culture (Zuo *et al.*, 2000).

1.2- Les constructions permettant l'inhibition de l'expression

La surexpression d'un gène conduit à son expression dans l'ensemble des cellules de l'organisme transformé. Cette expression ectopique peut conduire à l'apparition d'un phénotype qui ne sera pas forcément lié à la fonction du gène *in vivo*. Pour palier cela, des peupliers présentant une inhibition de l'expression du gène ont été produits. Pour cette étude, nous avons fait le choix d'une inhibition par le système de silencing de type RNAi (RNA interference). Ce système induit une extinction quasi-totale de l'expression du gène cible par la production d'ARNs doubles brins (ARNdb). Ceux-ci sont clivés en petits ARNs dont la présence induit un clivage ou une modification ciblée des ARNm endogènes correspondants (Fire, 1999). La revue de Bartel (2004) décrit la formation et le fonctionnement de ces petits ARNs, notamment chez les végétaux. De manière synthétique, les grands ARNdb sont clivés en petits ARNdb d'environ 22 nucléotides dans le noyau (figure 19). Ces petits ARNs sont ensuite exportés dans le cytoplasme de la cellule où ils sont pris en charge par une hélicase qui permet la formation de fragments simples brins. Le complexe ribonucléoprotéique RISC (RNAi-Induced Silencing Complex) peut alors recruter ces petits fragments simples brins afin de reconnaître les séquences complémentaires sur les ARNm cibles. Une fois fixé, le complexe RISC entraîne la dégradation des ARNm, ou empêche leur traduction (Bartel, 2004).

Les vecteurs choisis pour cette étude permettent la transcription d'un transgène formé d'une partie de la séquence codante du gène d'intérêt introduite deux fois, en orientation opposée et séparée par un intron (figure 19). La présence de l'intron dans le transgène codant l'ARNdb permet d'augmenter l'efficacité du silencing (Smith *et al.*, 2000).

Pour contrôler également l'expression du transgène, le vecteur pX7 permettant une expression contrôlée du transgène par du β -œstradiol a été utilisé (Guo *et al.*, 2003). Dans

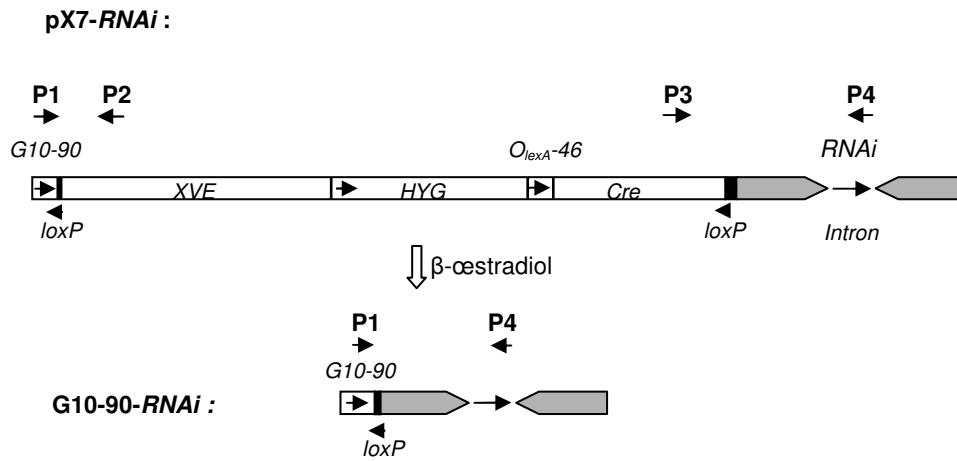


Figure 20 : Schéma de la cassette RNAi du vecteur pX7 présentant l'induction du transgène par du β -œstradiol (Guo *et al.*, 2003).

La cassette pX7-RNAi est formée d'un facteur de transcription chimérique *XVE* sous contrôle du promoteur constitutif *G10-90*, d'un gène de résistance à l'hygromycine *HYG*, de la recombinaise *Cre* du bactériophage P1 sous contrôle du promoteur *O_{lexA}-46* (huit copies du site de liaison à l'ADN *lexA* fusionnées au promoteur 35S CaMV), ainsi que des sites *loxP* de reconnaissance de la recombinaise. Le transgène (*RNAi*) est composé d'un *intron* de l'actine (résidus 1957-2111) et des séquences répétées inversées d'intérêt. Après ajout de β -œstradiol, la recombinaison par le système Cre/LoxP entraîne la formation de l'unité transcriptionnelle *G10-90-RNAi*. Les flèches P1 à P4 représentent la position des amorces utilisées pour le criblage génomique.

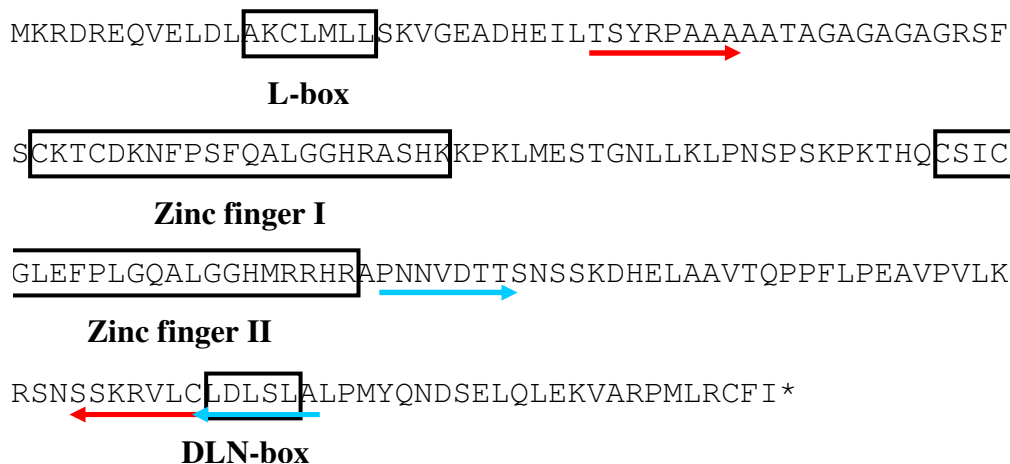


Figure 21 : Localisation des fragments RNAi choisis sur la séquence protéique de PtaZFP2.

Les motifs conservés entre les protéines C2H2-ZFP à deux doigts de zinc sont encadrés (voir Martin *et al.*, 2009 pour plus de précisions). La position des amorces utilisées pour l'amplification du fragment spécifique de 148 pb est indiquée par des flèches bleues, celle des amorces du fragment spécifique de 408 pb est indiquée par des flèches rouges.

cette construction, la protéine chimérique XVE, synthétisée constitutivement, est activée par le β -œstradiol (figure 20). Cette protéine, associée au β -œstradiol active le promoteur O_{LexA} -46 qui contrôle l'expression de la recombinase Cre. Cette dernière se fixe sur les sites loxP et permet ainsi une recombinaison amenant le transgène au contact du promoteur constitutif G10-90, rendant l'expression du transgène permanente pendant toute la durée de la vie de la plante.

Deux constructions formées de deux transgènes différents ont été réalisées. Le premier transgène est composé d'une séquence de 148 pb, située dans une zone très peu conservée entre les différentes protéines C2H2-ZFP, permettant une extinction ciblée de *PtaZFP2* (figure 21). Celui de la deuxième construction est composé d'une séquence de 408 pb contenant les motifs conservés entre les protéines C2H2-ZFP visant à éteindre la totalité de ces facteurs au cas où l'inhibition spécifique de *PtaZFP2* serait compensée par l'expression d'autres membres de cette famille multigénique.

Afin de contrecarrer un éventuel problème d'induction par le β -œstradiol, une dernière construction utilisant le vecteur pHellsgate 8 (pHg8) a été réalisée (Helliwell *et al.*, 2002). Ce vecteur contient un promoteur constitutif CaMV 35S permettant une expression permanente du transgène (figure 22). Dans ce cas, le transgène correspond à la séquence de 148 pb spécifique de *PtaZFP2* permettant une extinction ciblée de ce dernier.

Ce chapitre présente la production et le criblage des plantes transgéniques ainsi que les premiers résultats obtenus lors de leur caractérisation phénotypique. Nous avons ainsi procédé sur ces plantes à : (i) des mesures de croissances radiale et longitudinale avec ou sans flexion, (ii) une mesure des propriétés mécaniques des tiges, (iii) une étude anatomique des tiges et (iv) une étude de l'expression de gènes mécanosensibles.

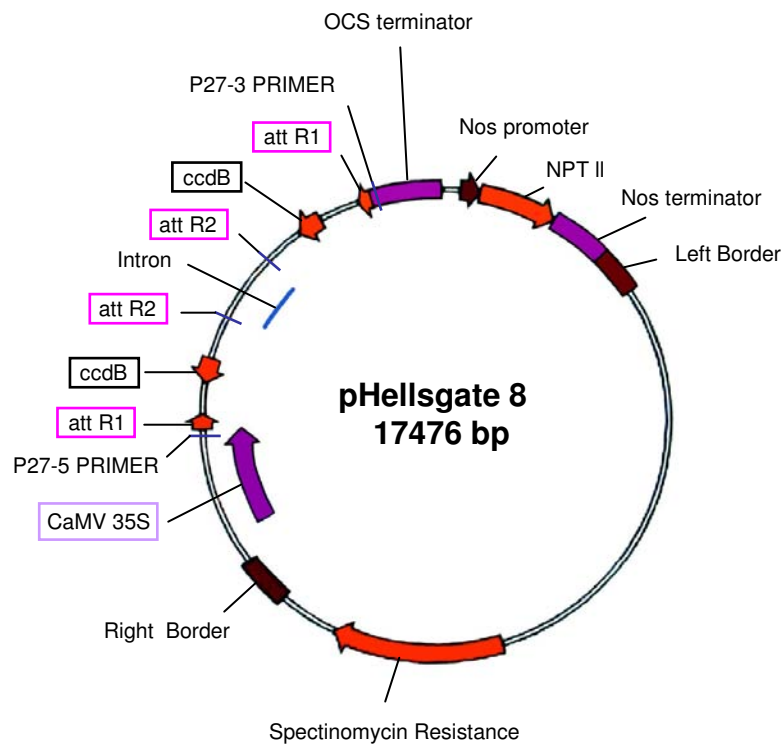


Figure 22 : Carte du vecteur binaire d'expression pHellsgate 8.

Les fragments de 148 pb sont insérés en orientation sens et antisens entre les sites attR1 et attR2 à la place des gènes *ccdB*. L'expression du transgène est contrôlée par un promoteur CaMV 35S.

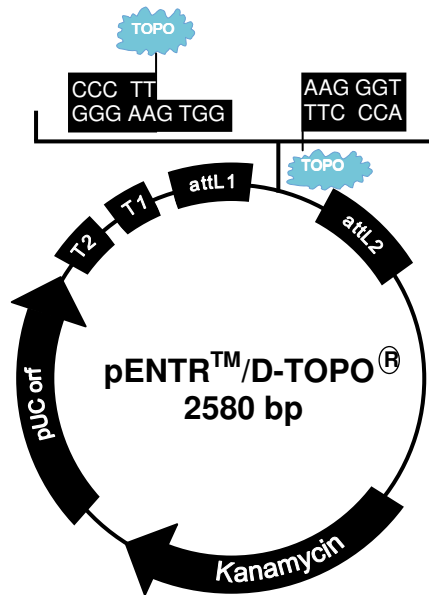


Figure 23 : Carte du vecteur d'entrée pENTR/D-TOPO (INVITROGEN).

Le transgène est inséré entre les deux sites attL1 et attL2 qui permettront la recombinaison homologue et donc l'insertion de celui-ci dans le vecteur d'expression.

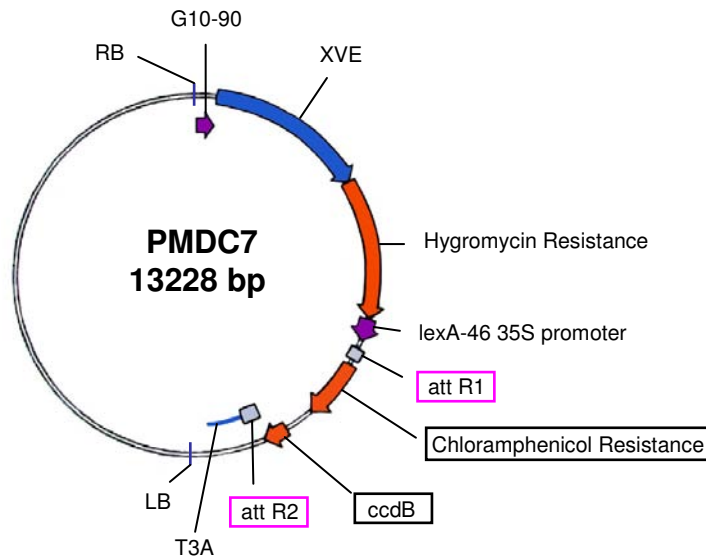


Figure 24 : Carte du vecteur binaire d'expression PMDC7.

Le transgène est inséré entre les deux sites attR1 et attR2 à la place des gènes de résistance au chloramphénicol et ccdB.

II- Matériel et méthodes

2.1- Réalisation des cassettes d'expression

2.1.1- Production des constructions de surexpression

Le vecteur d'expression PMDC7 utilisé pour ces transformations permet une insertion du transgène par recombinaison homologue au niveau des sites de recombinaison *att* grâce au système GATEWAY.

La première étape consiste en un clonage directionnel des transgènes dans les vecteurs d'entrée pENTR/D-TOPO (figure 23) du kit pENTR Directional TOPO Cloning (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Les séquences codantes des gènes *PtaZFP2*, *JrZFP2* et *GUS* (β -glucuronidase) ont été amplifiées avec une Taq polymérase Pfu (Promega, Charbonnières-les-Bains, France), à l'aide des couples d'amorces PENTR *PtaZFP2* S - PENTR *PtaZFP2* AS, PENTR *JrZFP2* S - PENTR *JrZFP2* AS et PENTR *GUS* S - PENTR *GUS* AS respectivement (annexe 2). Pour chaque réaction de clonage, 1,5 ng de produits PCR purifiés ont été mis en présence de 20 ng de vecteur pENTR/D-TOPO et de solution saline pendant 15 min à 22°C. L'insertion orientée des transgènes se fait grâce à la séquence CACC ajoutée en 5' des amorces sens. Les produits de ligation (2 μ l) ont ensuite été utilisés pour transformer des bactéries *Escherichia coli* TOPO 10 (Invitrogen) cultivées sur milieu LB sélectif (avec kanamycine). En parallèle, le vecteur binaire d'expression PMDC7 vide (figure 24), fourni par le docteur Nam-Hai CHUA (Laboratory of Molecular Cell Biology, Rockefeller University, USA), a été inséré dans des bactéries DB3.1 pour être multiplié.

La recombinaison homologue dans les vecteurs PMDC7 a été réalisée à l'aide du kit Gateway® LR Clonase™ II Enzyme Mix (Invitrogen) en suivant les recommandations du fournisseur. Pour chaque réaction de recombinaison, 150 ng de vecteur PMDC7 et 140 ng de la construction pENTR + transgène ont été incubés pendant 16h en présence de 2 μ l de LR clonase. La recombinaison a été arrêtée par un traitement de 10 min avec 2 μ g de protéinase K. Les vecteurs recombinés obtenus ont ensuite été insérés dans des bactéries TOPO 10 qui ont étéensemencées sur milieu sélectif. L'orientation et l'intégrité des transgènes insérés dans le vecteur PMDC7 ont été vérifiées par digestion et séquençage (MilleGen, Labège, France).

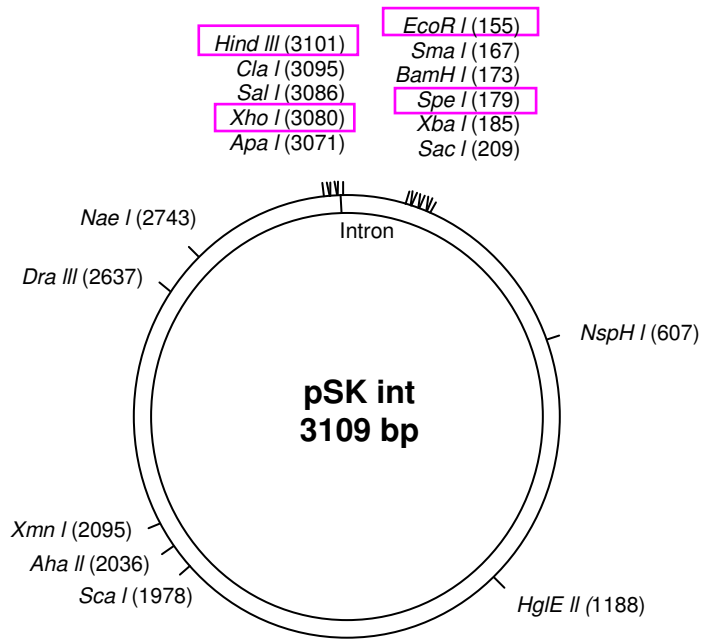


Figure 25 : Carte du vecteur pSK int.

Les fragments RNAi Spe ou RNAi NSpe sont insérés en orientation inverse de part et d'autre de l'intron au niveau des sites de restriction encadrés.

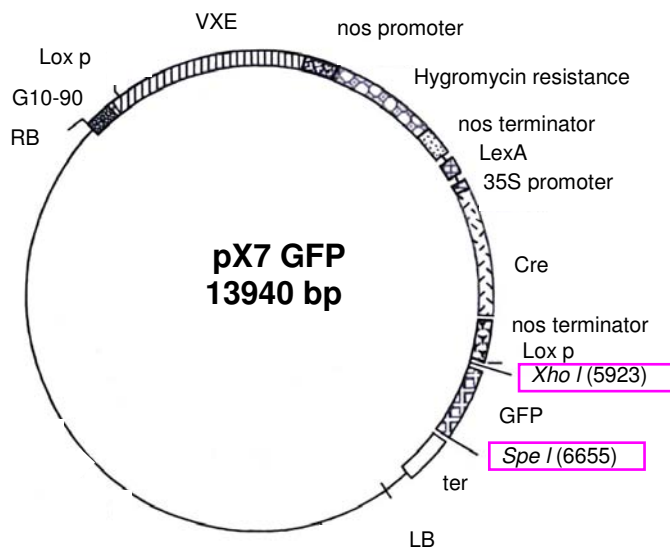


Figure 26 : Carte du vecteur binaire pX7 GFP.

Les transgènes sont insérés à la place de la séquence codant la GFP entre les sites de restriction Xho I et Spe I encadrés.

2.1.2- Production des constructions pX7RNAi

L'insertion des transgènes dans le vecteur binaire d'expression pX7-GFP (figure 26), fourni par le docteur Nam-Hai CHUA, a été réalisée par un clonage directionnel classique faisant intervenir un vecteur intermédiaire pSK int (figure 25). Les fragments de *PtaZFP2* spécifiques (RNAi Spe) et non spécifiques (RNAi NSpe) ont été amplifiés à l'aide d'amorces permettant l'insertion des sites de restriction souhaités (annexe 2, constructions pX7 RNAi Spe et pX7 RNAi NSpe). La localisation des amorces utilisées sur la séquence protéique de PtaZFP2 est présentée sur la figure 21.

Les différentes étapes conduisant à la production des deux constructions sont décrites sur la figure 27. Les différents fragments obtenus par PCR ont tout d'abord été purifiés, puis insérés dans des vecteurs pGEM-T Easy en suivant les recommandations du fournisseur (pGEM-T Easy vector system II, Promega). Pour le clonage des fragments sens, les vecteurs pSK int et pGEM-T Easy contenant les fragments RNAi Spe et NSpe sens ont été digérés à l'aide des enzymes de restriction *Xho I* et *Hind III*. Après purification sur gel, 3 ng de fragments RNAi Spe ou 8 ng de fragments RNAi NSpe ont été ligués pendant 16h à 4°C dans 70 ng de vecteurs pSK int linéarisés, puis clonés dans des bactéries *E. coli* JM 109. De la même façon, les fragments RNAi Spe et NSpe antisens ont été insérés dans les vecteurs pSK int contenant les fragments sens. Le vecteur pX7-GFP ainsi que les vecteurs pSK int Spe et NSpe ont alors été digérés par les enzymes *Xho I* et *Spe I* et les fragments d'intérêt ont été purifiés sur gel. La ligation a été effectuée à 4°C pendant 16h avec 260 ng de vecteurs pX7 linéarisés et 9 ng de la construction RNAi Spe (fragment sens, intron, fragment antisens) ou 21 ng de la construction RNAi NSpe (fragment sens, intron, fragment antisens). Les vecteurs recombinés obtenus ont ensuite été clonés dans des bactéries *E. coli* JM 109 qui ont étéensemencées sur milieu sélectif.

L'orientation et l'intégrité des transgènes insérés dans le vecteur pX7-GFP ont également été vérifiées par digestion et séquençage (MilleGen).

2.1.3- Production de la construction pHg8 RNAi

Comme dans le cas du vecteur PMDC7, le vecteur d'expression pHg8 utilisé pour ces transformations permet une insertion du transgène par le système GATEWAY. La séquence spécifique de 148 pb du gène *PtaZFP2* a été amplifiée à l'aide du couple d'amorces PENTR RNAi S - PENTR RNAi AS (annexe 2). Les différentes étapes conduisant à l'insertion des

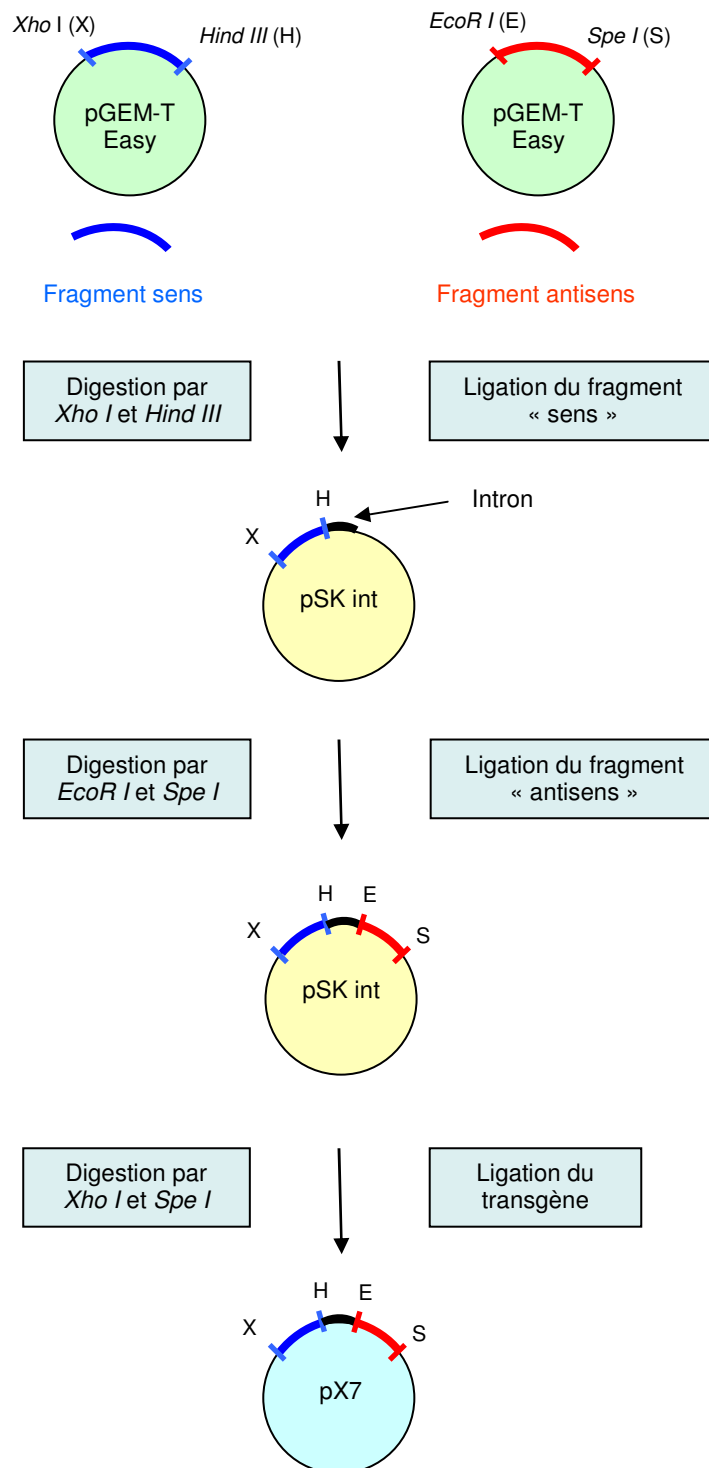


Figure 27 : Principe du clonage des fragments RNAi Spe et RNAi NSpe dans les vecteurs pSK int et pX7.

Les fragments RNAi Spe ou NSpe sens puis antisens sont insérés par digestion à l'aide des enzymes de restriction adaptées puis ligués dans le vecteur pSK int. Le transgène (fragment sens, intron et fragment antisens) est ensuite introduit dans le vecteur d'expression pX7 à l'aide d'une ligase.

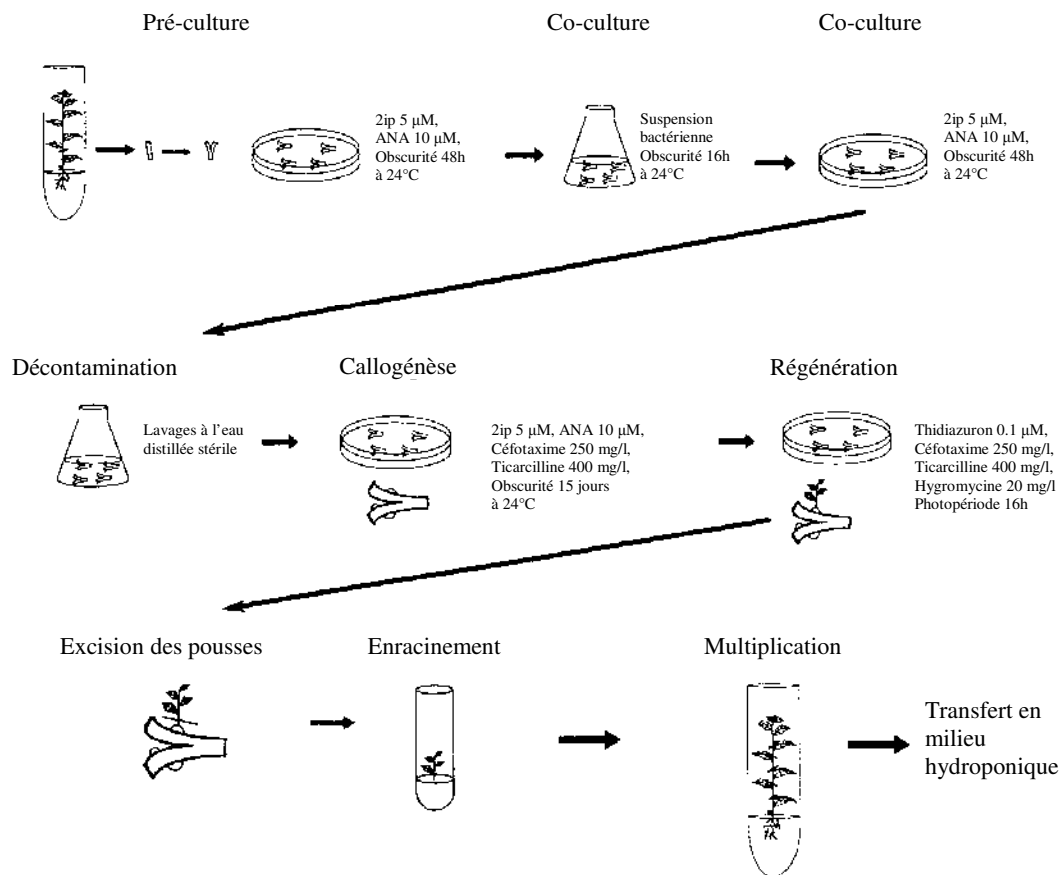


Figure 28 : Représentation schématique des étapes de la transformation génétique du peuplier par *Agrobacterium tumefaciens* (adapté de Leplé *et al.*, 1992).

transgènes RNAi Spe dans le vecteur d'expression pHg8 sont les mêmes que dans le paragraphe 2.1.1.

2.2- Transformation d'*Agrobacterium tumefaciens*

La souche C58pMP90 d'*Agrobacterium tumefaciens* (Koncz et Schell, 1986) a été transformée avec les différentes constructions plasmidiques par électroporation selon la technique décrite par Mattanovich *et al.* (1989). Les agrobactéries sont décongelées sur la glace et 200 ng de plasmide sont ajoutés. La suspension est ensuite placée dans une cuve à électroporation avec des électrodes distantes de 0,2 cm. Une décharge électrique de 2800 V (soit 14000 V.cm^{-1}) est appliquée avec un électroporateur EC100 (EC Apparatus Corporation). Après la décharge, les agrobactéries sont immédiatement placées dans 950 µl de milieu LB liquide à 28°C pendant 2h. Les bactéries sont ensuite étalées sur un milieu LB solide additionné des antibiotiques adaptés (gentamycine + rifampicine). Après une incubation de 48h à 28°C, les colonies sont formées. La transformation et les constructions sont vérifiées après extraction de l'ADN plasmidique et digestion par les enzymes de restriction appropriées.

2.3- Transformation génétique du peuplier

Le protocole de transformation génétique du peuplier utilisé ici (figure 28) est celui de Leplé *et al.* (1992). Le travail est réalisé sous une hotte à flux laminaire horizontal. Les différents milieux de culture et ustensiles utilisés sont stériles.

Des entre-nœuds de vitro-plants de peuplier âgés de 8 semaines sont utilisés pour la transformation. Sur un papier stérile, les explants de 8 à 10 mm de long sont excisés et fendus en deux sur la moitié de leur longueur. Ils sont alors déposés sur milieu MS (Murashige et Skoog, 1962) modifié additionné d'une cytokinine et d'une auxine synthétiques, 2ip (5 µM) et ANA (10 µM) respectivement, à raison de 15 explants par boîte de pétri. Les boîtes scellées avec du parafilm sont placées pendant 48h à l'obscurité et à 24°C.

Les explants sont ensuite baignés dans une solution de co-culture contenant les agrobactéries (environ 10^8 - 10^9 cfu/ml), à raison de 45 explants dans 100 ml de co-culture. Les milieux sont alors placés sous agitation à 125 tours/min, à l'obscurité et à 24°C pendant 16h. Suite à cette co-incubation en milieu liquide, les explants sont déposés sur milieu solide pour deux jours supplémentaires de co-culture à l'obscurité et à 24°C.

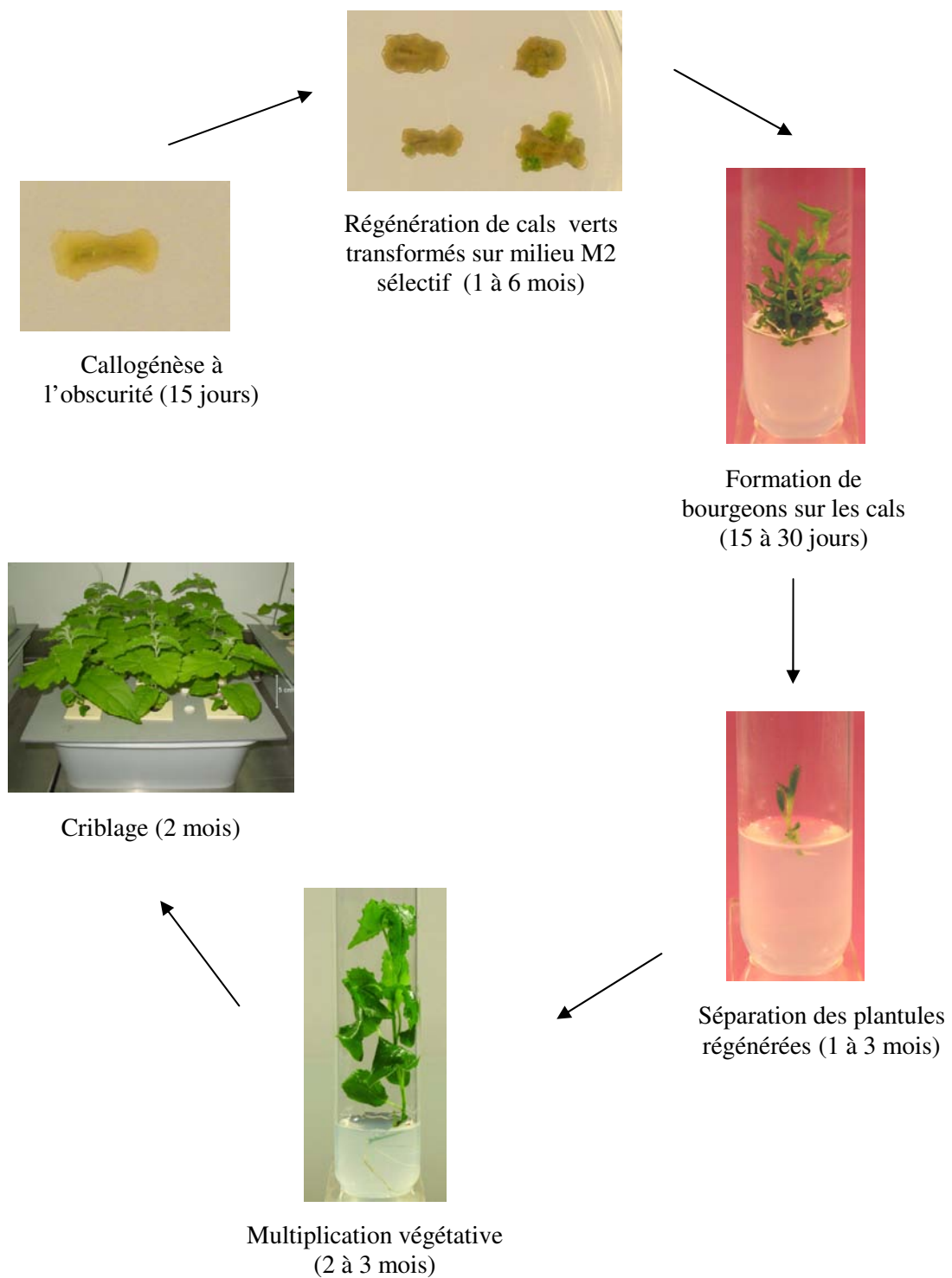


Figure 29 : Les différentes étapes de la régénération de peupliers transformés.
 Les durées minimale et maximale de chacune des étapes sont données entre parenthèses.

Au terme des deux jours de co-incubation en milieu solide, les explants sont prélevés et lavés avec de l'eau autoclavée (100 ml pour 45 explants). Sept lavages de 5 min sous agitation (125 tours/min) sont réalisés afin d'éliminer le plus possible de bactéries. Les explants sont ensuite tamponnés sur des serviettes en papier stériles et placés sur milieu de décontamination M2 (MS modifié + 2ip (5 μ M) + ANA (10 μ M) + céfotaxime (250 mg/l) + ticarcilline (400mg/l)). La céfotaxime et la ticarcilline permettent d'éliminer les agrobactéries. Les boîtes scellées avec du parafilm sont placées à l'obscurité et à 24°C pendant 15 jours afin de favoriser la callogenèse (figure 29).

Les explants sont ensuite repiqués sur milieu de sélection M2 + hygromycine (20 mg/l). Les boîtes scellées avec du parafilm, et contenant chacune 10 à 15 explants, sont placées en chambre de culture (16h de jour à 24°C et 8h de nuit à 20°C). Un repiquage sur milieu frais est réalisé tous les 15 jours jusqu'à l'apparition de cals verts (figure 29).

Quand les cals ont atteint une taille suffisante (> 3 mm), ils sont séparés de l'explant et placés sur milieu de régénération M3 (MS modifié + céfotaxime (250 mg/l) + ticarcilline (400mg/l) + hygromycine (20 mg/l) + thidiazuron (0.1 μ M)). Le thidiazuron est une cytokinine utilisée pour induire le bourgeonnement. Les cals sont numérotés et repiqués sur milieu frais tous les 15 jours jusqu'à l'apparition des bourgeons. La concentration de thidiazuron dans le milieu est alors divisée par 10 et les cals placés dans des tubes afin de permettre l'allongement des jeunes plantules (figure 29).

Lorsque les plantules ont atteint une taille de 2 cm environ, elles sont séparées du cal et placées sur milieu d'enracinement (figure 29). Au bout de quelques semaines, les jeunes plantules enracinées se sont suffisamment allongées pour être multipliées *in vitro*. Chaque entre-nœud est repiqué sur milieu de base pour développer une plante entière. Les plantules d'environ 4 cm sont ensuite progressivement acclimatées sur un milieu hydroponique pour subir les différents traitements.

2.4- Criblage des plantes transgéniques

2.4.1- Criblage d'expression sur les lignées transformées avec le vecteur PMDC7

Le criblage d'expression a été réalisé sur des plantes mesurant 10 à 15 cm, 1 mois après acclimatation sur milieu hydroponique (figure 29).

En se basant sur les travaux réalisés sur *A. thaliana* (Zuo *et al.*, 2000), nous avons apporté du 17 β -œstradiol, à une concentration finale de 5 μ M, dilué dans du DMSO (diméthyl

sulfoxide), dans la solution hydroponique. Un morceau de 6 cm de la tige (1 cm au-dessus du collet) de chaque plante traitée a ensuite été récolté et congelé dans l'azote liquide 24h après le traitement.

Une analyse de l'expression des gènes *PtaZFP2* et *JrZFP2* a été réalisée, à partir des ARNs totaux de tiges des différentes lignées, par RT-PCR semi-quantitative ou par RT-PCR quantitative en temps réel. La technique d'extraction des ARNs ainsi que les méthodes d'analyse par RT-PCR semi-quantitative ou quantitative en temps réel sont présentées dans le Matériels et Méthodes du premier chapitre. Les transcrits de *PtaZFP2* ont été amplifiés à l'aide des amorces Pe1 S et Pe1 AS décrites dans le chapitre 1. La détection des transcrits de *JrZFP2* a été réalisée à l'aide des amorces JrZFP S 5'-ATGGGGGAAGAACAAGGT-3' et JrZFP AS 5'-GACAACCCTCGTACTGTAG-3' qui permettent l'amplification d'un fragment de 225 pb.

2.4.2- Criblage des lignées recombinantes transformées avec le vecteur pX7

Pour les lignées RNAi transformées avec le vecteur pX7, une étude du niveau de recombinaison des constructions et de l'expression du gène *PtaZFP2* endogène a été réalisée après traitement au 17 β -œstradiol. Des plantes des différentes lignées régénérées mesurant 10 à 15 cm de haut et cultivées en hydroponie ont subi un traitement unique pendant 48h au 17 β -œstradiol à 5 μ M ou un traitement tous les 5 jours pendant 15 jours. A l'issue de ces traitements, les feuilles et une zone de 6 cm de la tige (1 cm au-dessus du collet) de chaque plante ont été récoltées, congelées dans l'azote liquide et stockées à -80°C jusqu'à l'extraction des ARNs. Pour chaque lignée, deux plantes ont été traitées, la tige de l'une d'elle a été fléchie et récoltée 30 min après la sollicitation, l'autre n'a subi aucune flexion.

Pour l'étude du niveau de recombinaison des constructions, l'ADN génomique (ADNg) des feuilles récoltées a été extrait selon le protocole modifié de Rogers et Bendich (1985) détaillé en annexe 3. La vérification de la recombinaison a été réalisée par amplification PCR. Le couple d'amorces P3 5'-CTGGACACAGTGCCCGTGTCGGA-3' et P4 5'-GGAATTCTGCAAACACACAAGACAAT-3' permet d'amplifier les constructions non recombinées, donc non fonctionnelles. Les constructions recombinées et fonctionnelles sont amplifiées à l'aide des amorces P1 5'-GCCGCCACGTGCCGCCACGTGCCGCC-3' et P4 (Guo *et al.*, 2003 ; figure 20). Les amplifications ont été réalisées à partir de 150 ng d'ADN. Après une étape de dénaturation de 5 min à 94°C, 35 cycles comportant une dénaturation de 30 secondes à 94°C, une hybridation de 30 secondes à 60°C et une élongation

de 2 min à 72°C ont été réalisés. L'amplification a été terminée par une élongation finale de 5 min à 72°C.

Une analyse par RT-PCR semi-quantitative de l'expression du gène *PtaZFP2* endogène a été effectuée à partir des ARNs totaux de tiges fléchies ou non des différentes lignées, à l'aide des amorces Pe1 S et Pe1 AS.

2.4.3- Détermination du nombre de copies du transgène par Southern blot

2.4.3.1- Extraction de l'ADN génomique et transfert sur membrane

L'ADNg des lignées transformées a été extrait selon le protocole détaillé en annexe 3. Les Southern blots ont été réalisés sur 10 µg d'ADNg digérés pendant 16h par *Eco RI* (plantes transformées avec PMDC7 *PtaZFP2*, PMDC7 *JrZFP2* et PMDC7 *GUS*) ou par *Hind III* (plantes transformées avec pX7 *Spe* et pX7 *NSpe*). Les ADNg digérés et préalablement séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8% (m/v) ont été transférés par capillarité, en présence de NaOH, sur membrane de nylon Hybond N+ (Amersham).

2.4.3.2- Synthèse et purification des sondes

Selon le vecteur d'expression utilisé, deux sondes différentes ont été produites par digestion de l'ADN plasmidique à l'aide d'enzymes de restriction adaptées. Pour les constructions de surexpression avec le vecteur PMDC7, un fragment de 928 pb situé dans le gène de fusion *XVE* a été obtenu par digestion pendant 1h30 à 37°C du plasmide avec l'enzyme *Xba I*. La sonde de 671 pb utilisée pour les constructions pX7-RNAi, située dans la partie TER du plasmide, a été digérée avec les enzymes *Sac I* et *Spe I*. Après migration sur gel, les sondes ont été purifiées à l'aide du kit GFX Gel Band Purification (GE Healthcare), et marquées par random-priming avec de l' α -³²P dCTP (3000 Ci/mmol) à l'aide du kit « Ready-To-Go, DNA labelling beads » (Amersham). Les nucléotides non incorporés sont éliminés par purification des sondes à l'aide du kit « Cleanmix » (Euromedex).

2.4.3.3- Préhybridation, hybridation et lavage des membranes

Les membranes de nylon sont préhybridées avec une solution de préhybridation (SSC 6X, Denhardt 5X, SDS 0,5%, ADN sperme de saumon 100 µg/ml) pendant 90 min à 65°C. La sonde marquée est dénaturée pendant 5 min à 100°C puis ajoutée au tampon d'hybridation de composition identique au tampon de préhybridation. L'hybridation est réalisée sur la nuit sous

agitation et à 65°C. Les membranes sont lavées une fois 5 min avec une solution de faible stringence (2X SSC, 0,5% SDS) à température ambiante, puis avec trois solutions de plus en plus stringentes (2X SSC, 0,5% SDS, 0,5X SSC, 0,1% SDS, puis 0,2X SSC, 0,1% SDS) pendant 15 min à 65°C. Les membranes, enveloppées dans du film Saran Wrap, sont alors exposées contre un écran phosphoimager (Kodak) pendant 16h.

2.5- Effet du 17 β -œstradiol sur l'expression des transgènes

Les traitements ont été réalisés sur des peupliers de 40 cm de haut, correspondant à la taille des peupliers utilisés dans les études menées au cours des trois chapitres précédents.

Pour l'étude de l'effet de la concentration en 17 β -œstradiol sur le niveau d'expression des transgènes, quatre concentrations différentes (5, 10, 25 et 50 μ M) ont été testées, correspondant à des doses induisant une forte expression des transgènes chez *A. thaliana* (Zuo *et al.*, 2000). Le traitement a été réalisé sur deux lignées surexprimant *PtaZFP2*, une lignée surexprimant *JrZFP2* et sur la lignée non transformée. Une zone de 5 cm de tige située 10 cm au-dessus du collet a été prélevée et congelée dans l'azote liquide 24h après l'ajout du 17 β -œstradiol.

La cinétique d'expression des transgènes a été réalisée suite à l'ajout de 17 β -œstradiol à 5 μ M final dans la solution hydroponique. Les ARNs ont été extraits sur des tiges non traitées ou récoltées 12, 24, 48, 96 et 144h après induction par les œstrogènes. Le traitement a été réalisé sur une lignée surexprimant *PtaZFP2*, une lignée surexprimant *JrZFP2* et sur la lignée non transformée. Pour chaque point, deux plantes de chaque lignée ont été prélevées. Des expériences de RT-PCR quantitative en temps réel ont été réalisées selon le protocole décrit dans le chapitre 1 pour étudier l'expression de différents gènes : *PtaAPX1* (*Populus tremula x alba ascorabate peroxidase 1*), *PtaSOD* (*Populus tremula x alba superoxyde dismutase*), *PtaTCH2*, *PtaTCH3*, *PtaTCH4* et *PtaACS6*.

Afin de localiser l'expression des transgènes dans différents organes, cinq types d'organes ont été récoltés 24h après ajout de 17 β -œstradiol à 5 μ M final dans le milieu : les racines, les nervures et le limbe de feuilles basales, le xylème et l'écorce (zone de 5 cm de tige située 10 cm au-dessus du collet) de trois lignées surexprimant *PtaZFP2*.

Les niveaux d'expression des différents gènes ont été analysés par RT-PCR quantitative en temps réel suivant la méthode présentée dans le chapitre 3. Les transcrits de *PtaAPX1* ont été détectés par l'amplification d'un fragment de 216 pb à l'aide des amorces APX S 5'-GTACGATCAGACACCCAGAT-3' et APX AS 5'-CCTTCTGGAGGTGGAT

CAGA-3'. Pour *PtaSOD* des fragments de 215 pb ont été amplifiés à l'aide des amorces PtaSOD S 5'-TGGCACCATCTTCTTTACCC-3' et PtaSOD AS 5'-TGACATTTCACAGAT CACCA-3'. Les amorces PtaTCH3 S 5'-ATGGCTTCATTTCTGCTGCT-3' et PtaTCH3 AS 5'-CATTTGGTTTTTGGGTTTTGG-3' ont permis l'amplification de fragments de *PtaTCH3* de 189 pb. Les amorces utilisées pour les gènes *PtaTCH2*, *PtaTCH4* et *PtaACS6* sont présentées dans le chapitre 3.

2.6- Phénotypage des lignées de surexpression

2.6.1- Etude de la croissance globale des plantes

L'étude de croissance globale a été réalisée en chambre de culture avec 16h de jour à 24°C et 40 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ d'intensité lumineuse et 8h de nuit à 20°C avec une humidité relative de $70 \pm 10\%$. Les peupliers de trois lignées (une lignée surexprimant *PtaZFP2*, une lignée surexprimant *JrZFP2* et la lignée non transformée) ont été installés en position verticale, fixés sur une barre en métal à l'aide de colliers. Avant l'installation, les feuilles les plus basses, au-dessous du collier, ont été enlevées. Afin d'éviter de blesser les tiges, la partie de la tige fixée avec le collier a été enroulée dans de la mousse.

Un traitement au 17 β -œstradiol à 5 μM final a été appliqué chaque semaine pendant deux mois à partir de l'installation sur la moitié des plantes. Lors de l'installation des plantes, des mesures de leur diamètre (5 cm au-dessus du collet) à l'aide d'un pied à coulisse et de leur hauteur ont été réalisées. Ces mesures ont été effectuées au bout d'un mois de traitement et à la fin de l'étude (au bout de deux mois).

2.6.2- Mesure de la croissance en diamètre en continu

Pour l'étude de l'effet de la surexpression de *PtaZFP2* et *JrZFP2* sur la croissance en diamètre de peupliers, des mesures de croissance en continu ont été réalisées à l'aide de capteurs LVDT (Linear Voltage Differential Transducer). Comme lors des études précédentes menées sur la lignée non transformée, le LVDT est placé à 10 cm environ au-dessus du collet, au milieu d'un entre-nœud. Les mesures de croissance ont été faites sur des plantes de plusieurs lignées traitées aux œstrogènes, avec et sans flexion.

Sur ces plantes, le niveau d'expression des transgènes a été vérifié en fin d'étude par RT-PCR quantitative en temps réel sur des ARNs de feuilles.

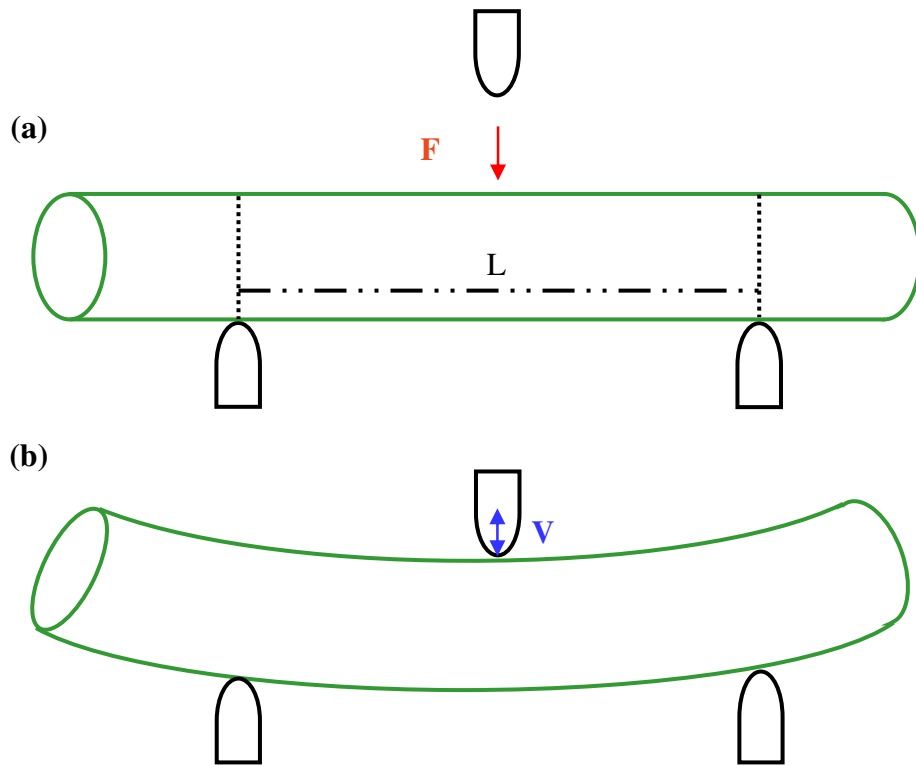


Figure 30 : Représentation schématique d'un fragment de tige sur lequel est appliqué un test de flexion 3 points.

La tige est montrée avant (a) et après (b) l'application de la sollicitation mécanique. La charge de compression F appliquée au centre de la tige entraîne un déplacement de compression V de 8 mm. L représente la distance entre les deux appuis.

2.6.3- Mesure de l'élasticité des tiges

L'élasticité des tiges des plantes utilisées pour l'étude de croissance globale a été mesurée à l'aide d'une machine d'essai (Instron, Model 5565, capteur 5kN, USA) contrôlée par le logiciel Blue Hill. Pour chaque plante, deux fragments de tige de 14 cm ont été prélevés : un fragment « basal » situé 10 cm au-dessus du collet et un fragment « apical » situé 15 cm en dessous de l'apex. Le module d'élasticité ou module de Young (E) a été obtenu à partir d'un test de flexion 3 points (figure 30). L'Instron mesure alors le déplacement de compression V (mm) en fonction de la charge de compression F appliquée (N).

Pour calculer le module de Young E (MPa), nous avons utilisé l'équation suivante :

$$E = Pe \frac{L^3}{48I} \quad [\text{avec } I = \pi(r^4/4)],$$

avec Pe ($\text{N} \cdot \text{mm}^{-1}$) la pente de la partie basale linéaire de la courbe force/déplacement obtenue au cours de l'essai, L (mm) la distance entre les deux appuis, I (mm^4) le moment d'inertie et r (mm) le rayon de la tige.

2.6.4- Etude cytologique des tiges

Des coupes ont été réalisées sur des tiges de peupliers non transformés ou surexprimant *PtaZFP2* ou *JrZFP2*. Un traitement hebdomadaire au 17β -œstradiol a été effectué durant le mois précédent le prélèvement. Six flexions ont été appliquées à l'aide du dispositif présenté dans les chapitres 2 et 3. Compte tenu des résultats obtenus dans le chapitre 3 et afin d'obtenir une induction optimale de la croissance en diamètre, les sollicitations mécaniques ont été réalisées comme suit : une flexion journalière pendant deux jours suivie de trois jours de repos et ce trois fois de suite.

Des morceaux de tiges fléchies et non fléchies (20 cm au-dessus du collet) ont été inclus dans de la résine LR-White selon le protocole décrit en annexe 4. Les coupes fines ont été réalisées à l'aide d'un Ultramicrotome (Reichert OM U2). Les colorations au bleu de toluidine et à la safranine bleu astra ont été réalisées selon le protocole décrit en annexe 4. Les mesures de la taille des différents tissus ont été réalisées à l'aide du logiciel Axiovision (Zeiss).

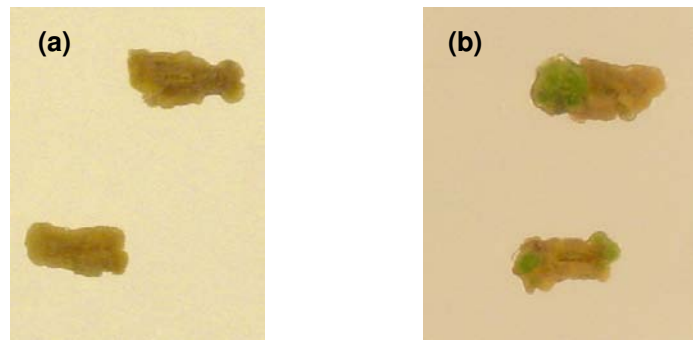


Figure 31 : Régénération de cals sur milieu sélectif 2 mois après la fin de la transformation.

Les explants (a) sont issus de la transformation avec le vecteur pHg8 RNAi Spe, les explants (b) proviennent de la transformation avec pX7 RNAi Spe.

Constructions de surexpression	Nb de lignées régénérées	Nb de lignées présentant une surexpression	Nb de lignées avec 1 insertion	Nb de lignées avec 2 insertions	Nb de lignées avec 3 insertions ou plus
PMDC7 PtaZFP2	24	20	7	6	7
PMDC7 JrZFP2	19	14	7	2	5
PMDC7 GUS	6	5	nd	nd	nd

Constructions RNAi	Nb de lignées régénérées	Nb de lignées présentant une recombinaison	Nb de lignées avec 1 insertion	Nb de lignées avec 2 insertions	Nb de lignées avec 3 insertions ou plus
pX7 RNAi NSpe	23	8	nd	nd	nd
pX7 RNAi Spe	18	12	nd	nd	nd

Tableau 1 : Récapitulatif du criblage des produits de transformation.

III- Résultats

3.1- Analyse des lignées transgéniques RNAi

3.1.1- La lignée pHg8 RNAi Spe

La lignée pHg8 RNAi Spe devait permettre une expression constitutive du transgène RNAi Spe et donc une inhibition permanente et spécifique de l'expression de *PtaZFP2*. Deux mois après la fin de la transformation, aucun cal n'était visible sur les boîtes avec milieu sélectif contenant les explants issus de la transformation avec la construction pHg8 RNAi Spe (figure 31a), alors que sur les boîtes contenant la transformation pX7 RNAi Spe des cals étaient visibles au bout du premier mois (figure 31b). Cette absence de développement de cals verts sur milieu sélectif s'est confirmée au cours de deux essais de transformation supplémentaires.

3.1.2- Criblage des lignées pX7RNAi

Dans le cas des transformations réalisées avec le vecteur pX7 visant à éteindre l'expression de *PtaZFP2* par le système du RNAi et inductible par les œstrogènes, des plantules ont pu être régénérées pour les deux constructions : 23 lignées pour la construction pX7 RNAi NSpe et 18 lignées pour la construction pX7 RNAi Spe (tableau 1).

Pour sélectionner les lignées transgéniques pX7 RNAi Spe et pX7 RNAi NSpe d'intérêt, nous avons tout d'abord réalisé un criblage d'expression du gène *PtaZFP2* endogène sur ces lignées suite à un traitement au 17 β -œstradiol. L'amplification par RT-PCR semi-quantitative n'a pas montré de différence d'expression de *PtaZFP2* entre les plantes sauvages et les lignées transformées, que ce soit pour les lignées ciblant spécifiquement le gène (lignées pX7 RNAi Spe) ou pour celles visant toutes les protéines C2H2-ZFP (lignées pX7 RNAi NSpe). Les lignées obtenues ne présentent pas de diminution de la quantité de transcrits de *PtaZFP2* après un traitement aux œstrogènes que ce soit en absence de stimulation mécanique ou après une flexion (données non montrées).

Pour vérifier si le phénomène de recombinaison lié aux œstrogènes, nécessaire à l'expression des transgènes dans la construction pX7, a bien eu lieu, un criblage génomique a été réalisé à partir des feuilles récoltées sur ces mêmes plantes. Pour ce criblage, nous avons

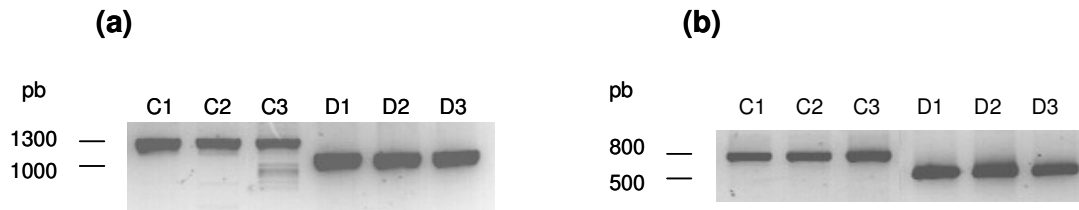


Figure 32 : Vérification de la présence des transgènes et de leur recombinaison sur l'ADNg de plantes transformées par pX7 RNAi NSpe et pX7 RNAi Spe.

Les ADNg ont été extraits à partir de feuilles de peupliers ayant subi trois traitements au 17 β -œstradiol à une concentration finale de 5 μ M pendant 15 jours. L'amplification PCR a été réalisée sur 3 lignées transformées avec la construction pX7 RNAi NSpe (C1 à C3) et 3 lignées transformées avec la construction pX7 RNAi Spe (D1 à D3) à l'aide des amorces P3-P4 amplifiant les fragments non recombines (a) ou P1-P4 amplifiant les fragments recombines (b).

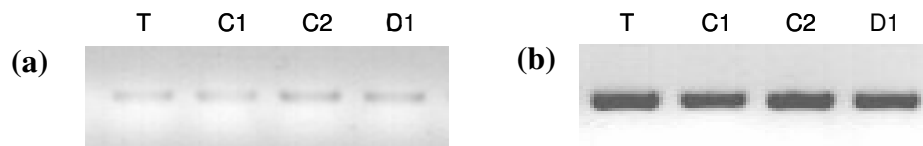


Figure 33 : Analyse par RT-PCR de l'expression de *PtaZFP2* dans des plantes pX7 RNAi Spe et pX7 RNAi NSpe.

Les ARNs totaux ont été extraits à partir de tiges de peupliers transformés avec pX7 RNAi NSpe (lignes C1 et C2) ou pX7 RNAi Spe (ligne D1) et de peupliers témoins (ligne T). Les plantes, traitées 3 fois au 17 β -œstradiol à 5 μ M pendant 15 jours, ont été fléchies (b) ou non (a) et récoltées 30 min après la flexion. Après synthèse des ADNc, l'amplification PCR a été réalisée sur 36 cycles à l'aide d'amorces spécifiques de *PtaZFP2*.

réalisé des amplifications PCR à l'aide de deux couples d'amorces, l'un permettant de vérifier l'insertion de la construction dans le génome (amorces P3 - P4), l'autre permettant de contrôler la recombinaison du système (amorces P1 - P4). Les zones amplifiées par ces couples d'amorces sont présentées sur la figure 20 (Guo *et al.*, 2003). Les résultats obtenus ont montré (i) que seulement 8 des 23 lignées pX7 RNAi NSpe ainsi que 12 des 18 lignées pX7 RNAi Spe ont bien intégré les constructions, mais aussi (ii) que la recombinaison est très faible après un seul traitement au 17 β -œstradiol à 5 μ M pendant 48h (données non montrées).

Au cours d'un deuxième essai, nous avons traité aux oestrogènes les 20 lignées ayant inséré la construction. Pour ce nouvel essai, trois traitements réguliers ont été appliqués pendant 15 jours sur les plantes. Dans ces nouvelles conditions, un meilleur taux de recombinaison a été obtenu puisqu'un fragment PCR de forte intensité est obtenu avec les amorces P1 - P4 (figure 32b). La présence d'amplification avec les amorces P3 - P4 montre que la recombinaison reste malgré tout incomplète (figure 32a). Sur ces mêmes plantes, aucune diminution visible de la quantité de transcrits de *PtaZFP2* endogène n'a pu être observée que ce soit en absence de stimulation mécanique (figure 33a) ou après une flexion (figure 33b).

Ces résultats suggèrent que les transgènes utilisés n'ont pas permis d'inhiber l'expression du gène *PtaZFP2* endogène. Aucune analyse phénotypique n'a encore pu être effectuée sur les plantes RNAi.

3.2- Criblage et analyse des lignées transgéniques surexprimant *PtaZFP2* et *JrZFP2*

3.2.1- Criblage des lignées régénérées

A l'issue des différentes étapes de régénération, 24 lignées transformées avec la construction PMDC7 *PtaZFP2*, 19 lignées PMDC7 *JrZFP2* et 6 lignées PMDC7 GUS ont été obtenues et multipliées (tableau 1).

L'intérêt étant d'avoir des lignées surexprimant les transgènes insérés, nous avons procédé à un premier criblage par analyse de l'expression des transgènes suite à l'ajout d'oestrogènes dans la solution nutritive. Des plantes de chacune des lignées régénérées ont donc été transférées en milieu hydroponique puis traitées avec une solution de 17 β -œstradiol à 5 μ M final.

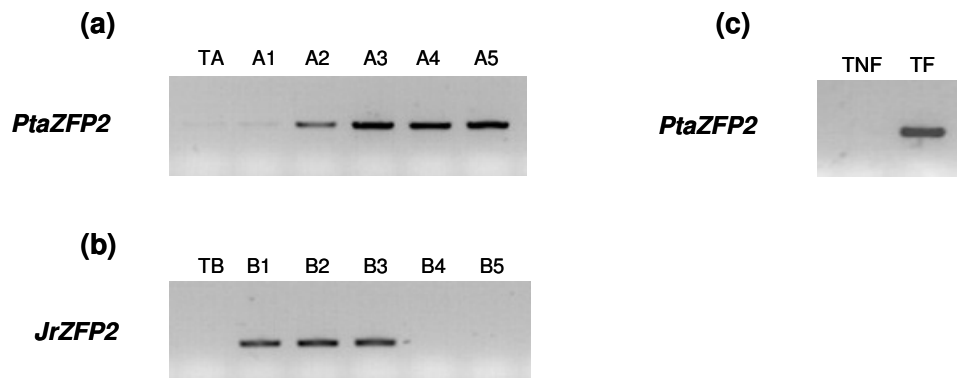


Figure 34 : Criblage par RT-PCR des plantes surexprimant *PtaZFP2* ou *JrZFP2*.

Les ARNs totaux ont été extraits à partir de tiges de peupliers transformés avec *PtaZFP2* (a, lignes A1 à A5) ou *JrZFP2* (b, lignes B1 à B5) et de peupliers témoins non fléchis (a, ligne TA, b, ligne TB et c, ligne TNF) ou fléchis (c, TF). Les tiges ont été récoltées 24h après l'ajout de 17β -œstradiol à 5 μ M final dans la solution nutritive. L'amplification a été réalisée à l'aide d'amorces spécifiques de *PtaZFP2* (a et c) ou de *JrZFP2* (b), en 31 cycles (a et b) ou en 28 cycles (c).

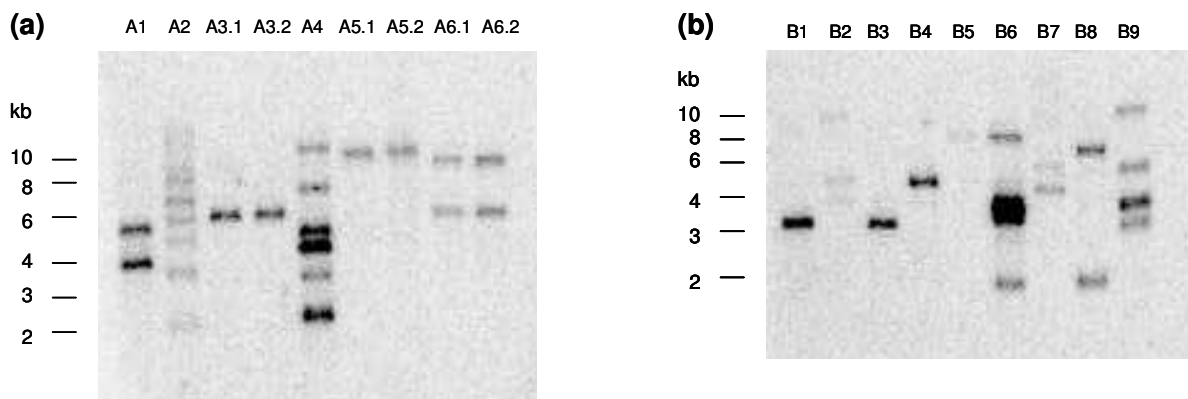


Figure 35 : Analyse par Southern blot du nombre de copies du transgène *PtaZFP2* ou du transgène *JrZFP2* introduites dans les lignées transformées.

Les digestions ont été réalisées à partir de 10 μ g d'ADNg de feuille. Les photos représentent les résultats obtenus à partir de certaines lignées transformées avec *PtaZFP2* (a) et *JrZFP2* (b). Certaines lignées présentent des doublons (A3.1 et A3.2, A5.1 et A5.2, A6.1 et A6.2) qui sont deux lignées régénérées à partir d'un même cal. La sonde utilisée correspond à un fragment de 928 pb situé dans le gène de fusion *XVE*.

Les résultats de RT-PCR semi-quantitative présentés en figure 34 ont permis de mettre en évidence que (i) l'ajout de 17 β -œstradiol induit bien une surexpression des gènes introduits, (ii) certaines plantes régénérées ne surexpriment pas le transgène (lignées A1, B4 et B5) et (iii) les niveaux d'expression varient selon les lignées mais sont comparables à celui d'une plante fléchie (TF). Au terme de ce premier criblage, il s'avère que 20 des 24 lignées transformées avec *PtaZFP2*, 14 des 19 lignées transformées avec *JrZFP2* et 5 des 6 lignées transformées avec *GUS* présentent réellement une surexpression (tableau 1).

Après ce criblage d'expression, nous avons procédé à un deuxième criblage, génomique celui-ci, afin de déterminer le nombre de copies de chaque transgène insérées dans les différentes lignées et de privilégier les plantes présentant une insertion unique pour la suite des travaux. A ce jour, ces travaux n'ont pas été réalisés pour les lignées transformées avec le gène *GUS*. Les résultats du Southern-blot montrent (i) que le nombre de copies insérées varie de 1 à 7 selon les lignées et (ii) que deux plantes issues d'un même cal présentent un profil de restriction identique et sont donc bien issues d'un même événement de recombinaison (figure 35a et b). Ce deuxième criblage a permis de montrer que 7 des lignées transformées avec *PtaZFP2*, mais aussi 7 des lignées transformées avec *JrZFP2* présentent une seule insertion de la construction.

Les résultats de ces différents criblages sont récapitulés dans le tableau 1.

3.2.2- Mise au point des conditions d'induction des transgènes par les œstrogènes dans les lignées de surexpression

Avant de procéder à l'analyse phénotypique des lignées surexprimant *PtaZFP2* ou *JrZFP2*, nous avons préalablement mis au point les conditions d'induction des transgènes dans les différentes lignées conservées.

3.2.2.1- Effet de la dose de 17 β -œstradiol appliquée sur le niveau d'expression des transgènes

Nous avons étudié l'effet de quatre doses croissantes de 17 β -œstradiol sur l'expression des transgènes dans les tiges de plantes de trois lignées transformées : les lignées A9 et A23 surexprimant *PtaZFP2* et la lignée B18 surexprimant *JrZFP2*. Pour une concentration donnée d'hormone, des différences importantes du niveau d'expression des transgènes sont observées entre les différentes lignées (figure 36). Ainsi, pour une dose de 5 μ M finale de 17 β -œstradiol

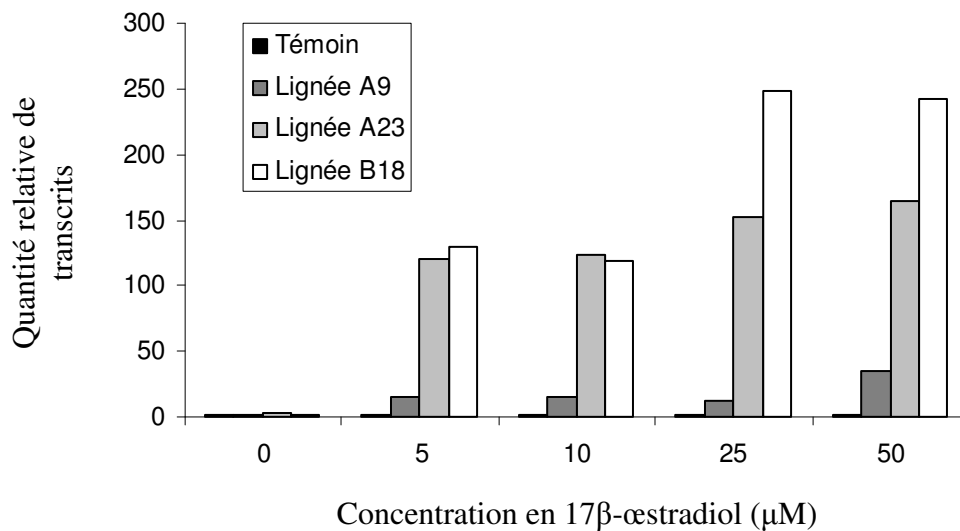


Figure 36 : Niveau d'expression des transgènes *PtaZFP2* et *JrZFP2* en fonction de la concentration en 17β-œstradiol dans le milieu nutritif.

Le 17β-œstradiol a été ajouté dans la solution nutritive à quatre concentrations finales différentes (5, 10, 25 et 50 μM). Les ARNs totaux ont été extraits sur des fragments de tige de 5 cm récoltés 24h après le traitement. Les quantités relatives de transcrits ont été obtenues par PCR quantitative en temps réel à partir de la lignée non transformée (Témoin), de deux lignées transformées avec *PtaZFP2* (A9 et A23) et d'une lignée transformée avec *JrZFP2* (B18).

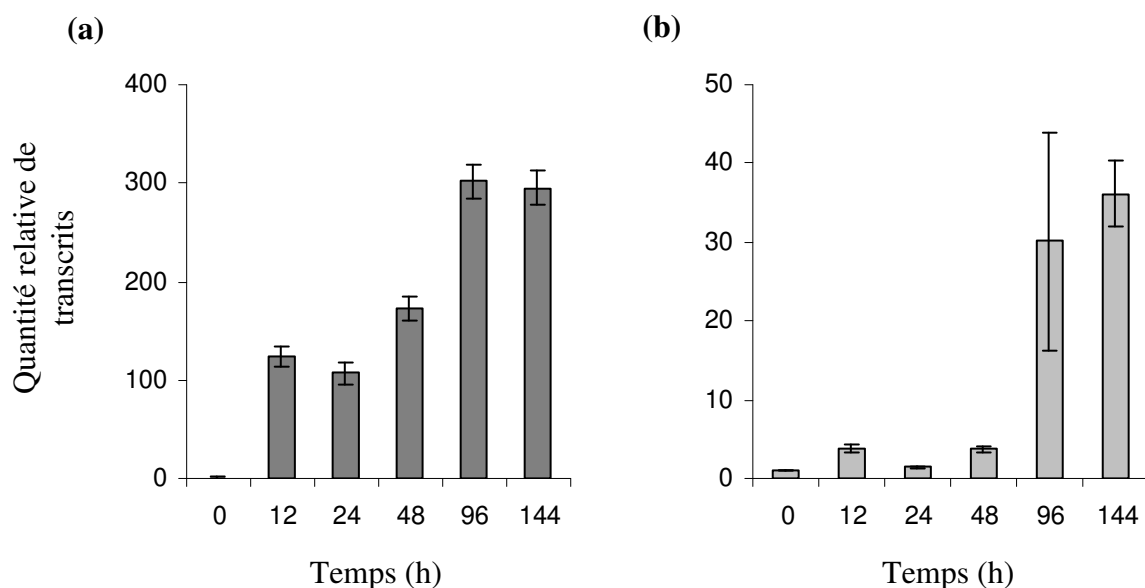


Figure 37 : Cinétique d'expression des transgènes *PtaZFP2* et *JrZFP2* suite à l'ajout de 17β-œstradiol dans le milieu nutritif.

Le 17β-œstradiol a été ajouté dans la solution nutritive à 5 μM final. Les ARNs totaux ont été extraits sur des fragments de tige de 5 cm de plantes non traitées (0) ou récoltées 12h, 24h, 48h, 96h, 144h après le traitement. Les quantités relatives de transcrits ont été obtenues par PCR quantitative en temps réel à partir de la lignée A39 transformée avec *PtaZFP2* (a) et de la lignée B9 transformée avec *JrZFP2* (b). Les résultats représentent les valeurs moyennes obtenues à partir de 2 plantes (±ES).

dans le milieu, l'augmentation de la quantité relative de transcrits 24h après le traitement varie de 15 pour la lignée A9 à 130 pour la lignée B18. Quelle que soit la lignée, il n'y a pas de différence de quantité de transcrits pour les concentrations de 5 à 10 μM finales. Les concentrations de 25 à 50 μM finales entraînent une augmentation plus ou moins importante, selon la lignée, de la quantité de transcrits présents. Pour les lignées A23 et B18, l'augmentation de la quantité de transcrits observée avec ces concentrations élevées en hormone par rapport à des concentrations comprises entre 5 et 10 μM est respectivement de 1,3 et 2. Pour la lignée A9, une dose de 50 μM est nécessaire pour doubler la quantité de transcrits par rapport aux autres concentrations testées (figure 36).

Ces résultats montrent qu'une concentration de 5 μM finale de 17 β -œstradiol ajoutée dans le milieu est suffisante pour induire une expression conséquente des transgènes.

3.2.2.2- Cinétique d'expression des transgènes suite à l'ajout de 17 β -œstradiol

Afin de déterminer la durée d'induction des transgènes suite à un apport unique d'œstradiol dans le milieu, nous avons mesuré, au cours du temps, le niveau d'expression des transgènes dans les tiges de plantes de deux lignées transformées. Comme le montre la figure 37, pour un temps donné, une différence importante du niveau d'expression des transgènes est observée entre les lignées utilisées. Dans le cas de la lignée surexprimant *PtaZFP2*, l'induction de l'expression du transgène débute dès 12h après l'ajout de 17 β -œstradiol dans le milieu. La quantité relative de transcrits reste constante pendant les 36 heures suivantes (110 à 170 fois supérieure à celle observée avec des plantes de la même lignée, mais non traitées). Une induction de 300 fois de l'expression du transgène est détectée après 96h de traitement. Cette forte induction est encore visible au bout de 144h (figure 37a). La cinétique obtenue avec la lignée ayant intégré *JrZFP2* présente un profil très similaire, mais les taux d'induction pour les temps d'incubation inférieurs à 96h sont de 5 à 10 fois inférieurs à ceux observés pour la lignée surexprimant *PtaZFP2* (figure 37b).

Ces résultats indiquent que l'expression des transgènes dure au moins pendant les six jours qui suivent l'ajout 17 β -œstradiol dans le milieu.

3.2.2.3- Profil d'expression des transgènes dans les différents organes

La cassette d'expression du vecteur PMDC7 permet une expression contrôlée du transgène dans le temps, mais ne permet pas de spécifier la localisation de son expression

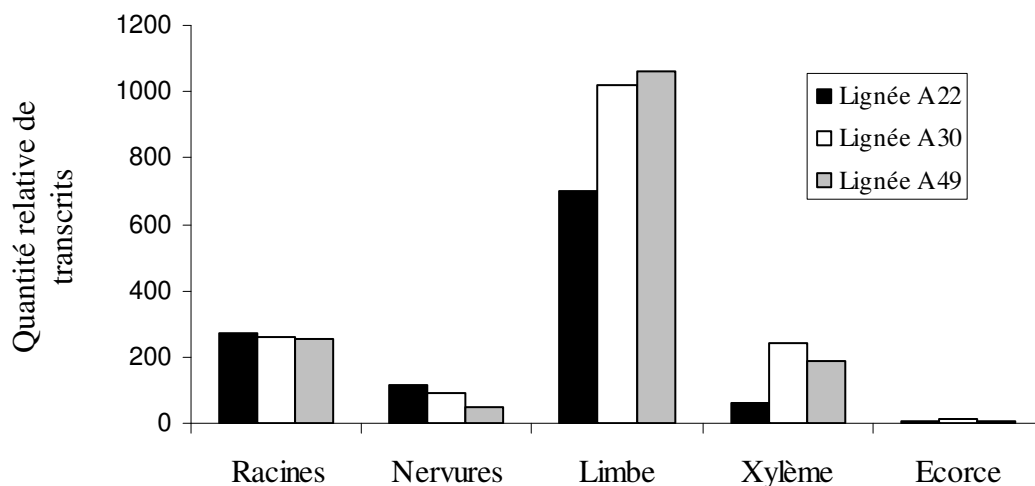


Figure 38 : Niveau d'expression des transgènes dans différents organes 24h après l'ajout de 17 β -œstradiol dans le milieu nutritif.

Le 17 β -œstradiol a été ajouté dans la solution nutritive à 5 μ M finale. Les ARNs totaux ont été extraits à partir des racines, des nervures et des limbes des feuilles les plus basses, ainsi que du xylème et de l'écorce (5 cm de tige située 10 cm au-dessus du collet). Les quantités relatives de transcrits ont été obtenues par PCR quantitative en temps réel à partir de trois lignées (A22, A30, A49) transformées avec *PtaZFP2*.

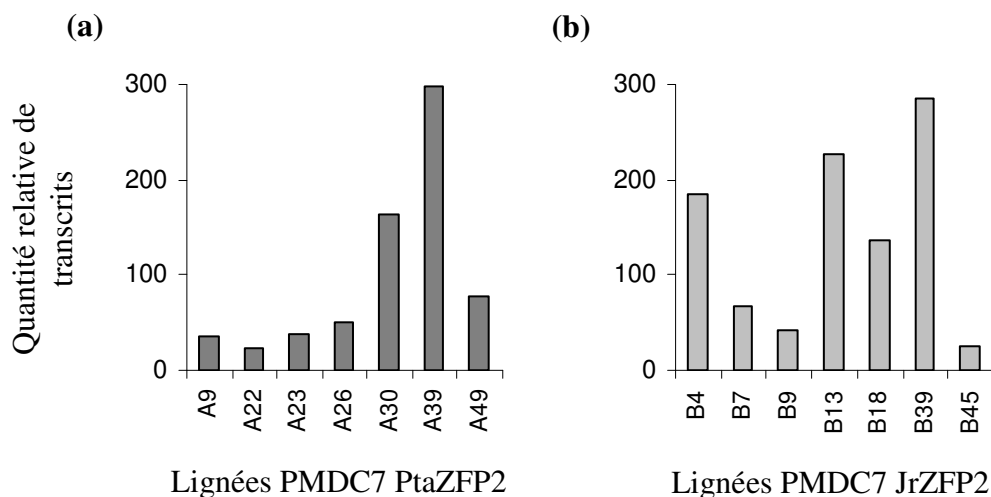


Figure 39 : Niveau d'expression de *PtaZFP2* et *JrZFP2* dans les différentes lignées 24h après l'ajout de 17 β -œstradiol dans le milieu nutritif.

Le 17 β -œstradiol a été ajouté dans la solution nutritive à 5 μ M finale. Les ARNs totaux ont été extraits à partir de fragments de 6 cm de tige situés 1 cm au-dessus du collet. Les quantités relatives de transcrits ont été obtenues par PCR quantitative en temps réel à partir des sept lignées ayant inséré une copie de *PtaZFP2* (a) ou des sept lignées ayant inséré une copie de *JrZFP2* (b).

dans les différents organes et tissus. Pour déterminer le profil d'expression des transgènes au sein de la plante, nous avons traité des peupliers issus de trois lignées surexprimant *PtaZFP2*. Comme le montre la figure 38, des variations importantes du niveau d'induction du transgène sont observées entre les différents organes et tissus étudiés. Quelle que soit la lignée transgénique utilisée, l'accumulation des transcrits est très importante dans les limbes (x920) alors que l'induction est très faible dans l'écorce des tiges (x9). Des niveaux d'induction intermédiaires sont obtenus dans le xylème (x160), dans les nervures (x85) et dans les racines (x260).

L'augmentation du niveau d'expression des transgènes dans les plantes transformées traitées aux œstrogènes indique que le 17 β -œstradiol circule, *via* le xylème, dans la plante entière. Cependant, les variations du niveau d'expression entre les différents organes et tissus révèlent probablement une différence d'accès de celui-ci aux différentes parties de la plante.

3.2.2.4- Mesure du niveau d'expression des transgènes dans les lignées transgéniques indépendantes

Après avoir mis au point les conditions d'induction, la dernière étape de la caractérisation des lignées transgéniques a consisté à comparer le niveau d'expression des transgènes 24h après l'ajout de 17 β -œstradiol (5 μ M). La variabilité entre les différentes lignées est relativement importante. Ainsi, pour les lignées surexprimant *PtaZFP2*, des différences d'induction de 23 fois pour la lignée A22 à 300 fois pour la lignée A39 ont pu être détectées (figure 39a). Les variations entre lignées sont toutes aussi importantes pour les lignées surexprimant *JrZFP2* (figure 39b).

Pour l'étude phénotypique de ces plantes, nous avons donc privilégié l'utilisation de lignées présentant les niveaux d'induction les plus forts.

3.3- Analyse phénotypique des lignées de surexpression

3.3.1- Effet de la surexpression des transgènes sur la croissance globale des plantes

Pour cette étude, nous avons traité, à l'œstradiol, deux lignées transformées (A30 surexprimant *PtaZFP2* et B4 surexprimant *JrZFP2*) ainsi que la lignée non transformée,

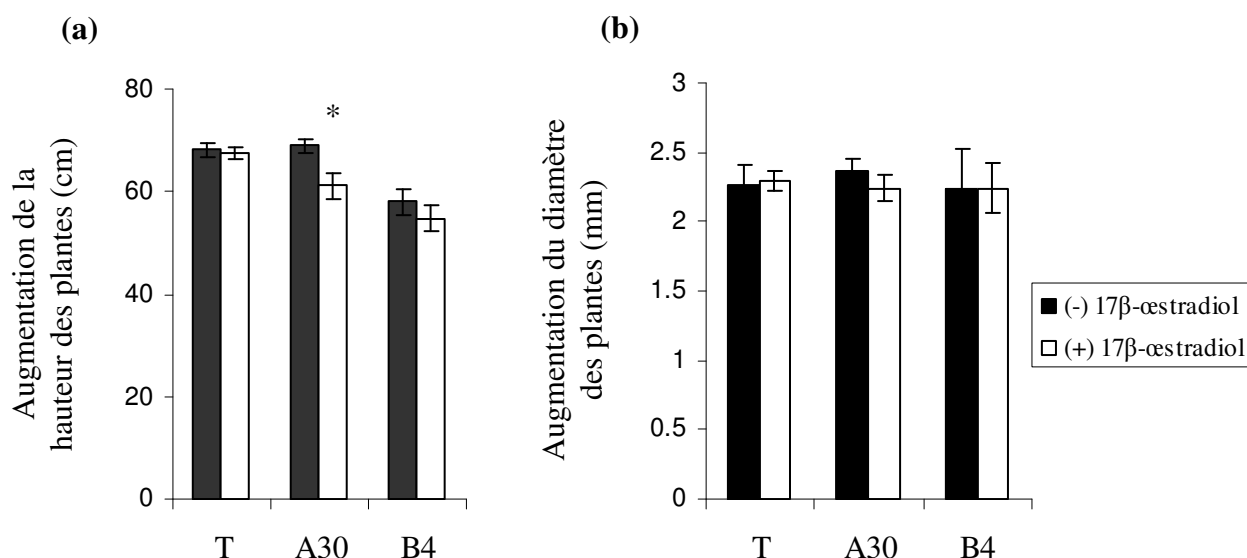


Figure 40 : Effet de la surexpression de *PtaZFP2* et *JrZFP2* sur la croissance primaire et secondaire des tiges de peuplier.

Un traitement hebdomadaire au 17β-œstradiol à 5 μM final a été réalisé pendant deux mois. La hauteur (a) et le diamètre (b) des plantes de trois lignées (sauvage T, et transgéniques A30 et B4), traitées ou non traitées à l'hormone ont été mesurés avant le début du traitement puis à l'arrêt de l'étude. Les résultats représentent les augmentations de croissance moyennes obtenues à partir de 6 plantes (±ES). Les astérisques (*) représentent une différence significative au seuil de 5% (test de Student).

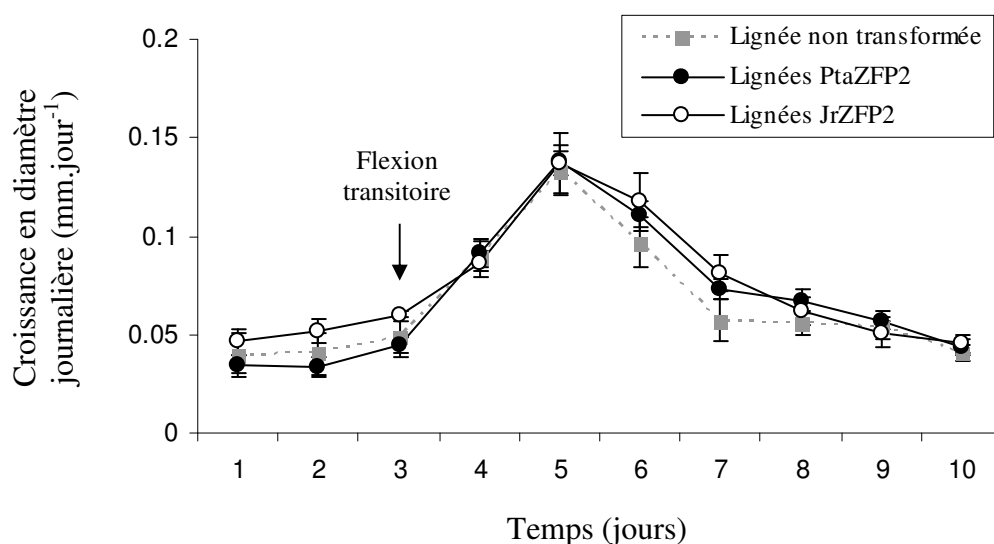


Figure 41 : Effet de la surexpression de *PtaZFP2* et *JrZFP2* sur la réponse de croissance en diamètre des peupliers suite à une flexion.

Les plantes traitées au 17β-œstradiol ont subi une flexion transitoire (flèche). Les courbes de croissance en diamètre obtenues à l'aide de LVDT représentent les valeurs moyennes (±ES) obtenues à partir de 6, 10 ou 9 plantes de la lignée non transformée, ou de lignées transformées avec *PtaZFP2* ou *JrZFP2* respectivement.

pendant deux mois. Des mesures de diamètre et de hauteur des tiges ont été effectuées au début de l'étude puis à l'issue des deux mois de traitement hebdomadaire à l'hormone.

Après les deux mois de traitement au 17β -œstradiol, les plantes sauvages traitées aux œstrogènes ne présentent pas de modification significative de taille par rapport aux plantes non traitées (figure 40a). Il faut noter qu'à l'issue des deux mois de traitement, un dessèchement de l'extrémité des feuilles provoqué par le traitement est observé.

Pour les deux lignées transformées, la croissance est inférieure de 11,2% (lignée A30) et 5,6% (lignée B4) par rapport à celle des plantes des mêmes lignées, mais non traitées. Donc, la surexpression des transgènes suite au traitement au 17β -œstradiol entraîne une légère diminution de la croissance en longueur. L'analyse statistique montre un effet significatif de la surexpression de *PtaZFP2* ($\alpha=5\%$) sur la variation de croissance en longueur des plantes.

En ce qui concerne la croissance en diamètre des plantes, pour les trois lignées testées, aucune différence significative n'est visible sur l'augmentation de diamètre entre les plantes traitées au 17β -œstradiol et les plantes non traitées (figure 40b). La surexpression de *PtaZFP2* ou de *JrZFP2* ne semble pas modifier la croissance en diamètre.

La surexpression de *PtaZFP2* semble s'accompagner d'une diminution de la croissance en longueur des plantes, mais ne paraît pas affecter leur croissance en diamètre.

3.3.2- Effet de la surexpression de PtaZFP2 et JrZFP2 sur la variation de croissance en diamètre des tiges en temps réel suite à une flexion

Les résultats précédents tendent à montrer que la surexpression des transgènes pendant deux mois n'entraîne pas de variation du diamètre des tiges. Nous avons alors procédé à des mesures en temps réel à l'aide de capteurs LVDT, selon le dispositif présenté dans les chapitres précédents. Cette étude de croissance a été réalisée sur des plantes de différentes lignées, après traitement au 17β -œstradiol, en absence de sollicitation mécanique ou suite à une flexion.

Dans un premier temps, les résultats obtenus montrent qu'en absence de sollicitation mécanique, la surexpression de *PtaZFP2* ou de *JrZFP2* ne modifie pas la croissance en diamètre des plantes (données non montrées). Ces analyses de croissance en diamètre en continu corroborent donc celles obtenues avec un traitement hormonal de deux mois. Comme pour les plantes sauvages, la flexion déclenche, chez les lignées transgéniques traitées au 17β -œstradiol, une augmentation de la croissance en diamètre pendant au moins 5 jours avec un pic de croissance le deuxième jour suivant la flexion (figure 41). Aucune différence

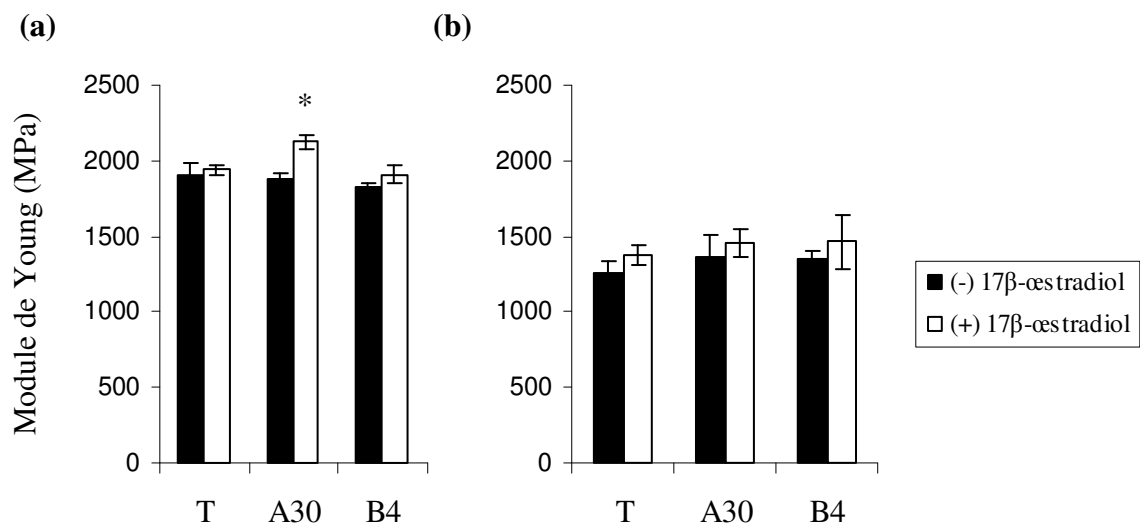


Figure 42 : Effet de la surexpression de *PtaZFP2* et *JrZFP2* sur la rigidité des tiges de peuplier.

Un traitement hebdomadaire au 17β-œstradiol à 5 μM final a été réalisé pendant deux mois sur des plantes non transformées (T), transformées par *PtaZFP2* (A30), transformées par *JrZFP2* (B4). Le module d'élasticité (module de Young) des tiges des plantes traitées (+) ou non traitées (-) a été mesuré à la fin du traitement sur des fragments basaux (a) ou apicaux (b) des tiges. Les résultats représentent les valeurs moyennes obtenues à partir de 3 plantes (±ES). Les astérisques (*) représentent une différence significative au seuil de 5% (test de Student).

significative n'est observée entre les lignées qui surexpriment *PtaZFP2*, celles qui surexpriment *JrZFP2* et la lignée non transformée au niveau de la réponse de croissance en diamètre. Une analyse plus fine à l'aide de droites de régression ne montre également aucun effet de la surexpression sur la vitesse de recouvrement de la croissance en diamètre journalière observée avant la flexion (données non montrées).

3.3.3- Effet de la surexpression des transgènes sur le module d'élasticité des tiges

Un autre facteur important pouvant jouer un rôle dans la réponse des plantes aux sollicitations mécaniques est le module de Young E (Anten *et al.*, 2006) rendant compte de la rigidité des tiges. Pour tester le rôle de *PtaZFP2* ou de *JrZFP2* sur ce paramètre, nous avons mesuré le module de Young de tiges de plantes transformées ou non après deux mois de traitement au 17β -œstradiol. Les résultats présentés sur la figure 42a montrent que la surexpression de *PtaZFP2* induit une augmentation statistiquement significative du module d'élasticité de 240 MPa, dans la partie basale des tiges, par rapport à des plantes de la même lignée non traitées. L'augmentation observée, qui reste relativement faible, n'est pas présente, ou n'est pas encore visible dans la partie apicale des tiges (figure 42b). Cette variation n'est pas retrouvée chez les plantes de la lignée sauvage qui ne surexpriment pas le gène, ni chez celles de la lignée B4 surexprimant *JrZFP2*, que ce soit dans la partie basale des tiges ou dans leur partie apicale (figure 42a et b).

La surexpression de *PtaZFP2* semble induire une légère augmentation du module d'élasticité des tiges. Ces résultats obtenus avec un faible nombre de plantes (trois par traitement) demandent cependant à être confirmés.

3.3.4- Effet de la surexpression des transgènes sur l'anatomie des tiges

Les propriétés mécaniques des tiges étant dues, en partie, à l'anatomie des tissus qui les composent, nous avons comparé l'anatomie de tiges de plantes sauvages et transformées en coupes semi-fines. Pour cette étude, les plantes surexprimant *PtaZFP2* ou *JrZFP2* et les plantes sauvages ont été traitées pendant un mois au 17β -œstradiol et ont subi trois séries de deux flexions successives selon le protocole décrit dans la partie 2.6.4 de ce chapitre. Ayant rencontré des problèmes de régénération de plantes au cours de cette expérience, les coupes de zones fléchies et de zones non sollicitées ont été réalisées sur les mêmes plantes, respectivement 10 cm et 20 cm au-dessus du collet.

A partir des photographies réalisées (figures 43 et 44), nous avons effectué une première analyse en mesurant l'épaisseur des différents tissus composant la tige à l'aide du logiciel Axiovision. Aucune différence visible n'a pu être mise en évidence au niveau de l'épaisseur du xylème, du cambium ou du parenchyme cortical entre les plantes sauvages (figure 43) et les plantes surexprimant *PtaZFP2* (figure 44) ou *JrZFP2*, que ce soit pour les coupes effectuées dans la zone fléchie ou dans la zone non sollicitée de la tige. Ces résultats confirment notamment que le gène *PtaZFP2* n'influence pas la croissance en diamètre des tiges.

Par contre, à la fois chez les plantes sauvages et chez les plantes transformées, des différences anatomiques importantes sont observées entre les parties fléchies (figures 43f-o et 44f-o) et les parties non sollicitées (figures 43a-e et 44a-e), d'une part, et au sein même de la zone fléchie d'autre part. En effet, au niveau de la zone de la tige ayant subi les flexions, le cambium apparaît plus épais du côté compressé situé contre le tube (figures 43g et 44g), que du côté tendu opposé au tube (figures 43l et 44l). Ces résultats indiquent une activité cambiale plus intense dans cette partie de la zone fléchie. La composition du bois mis en place suite aux flexions apparaît également fortement modifiée. En particulier, du côté compressé de la tige, les vaisseaux sont moins nombreux et rassemblés en cercles (figures 43f et 44f). Un grossissement plus important au niveau des fibres du xylème de cette zone montre la présence d'une couche constituée de cellulose (coloration bleue) rappelant la couche G caractéristique du bois de tension (figures 43j et 44j). Toutes ces modifications ne sont retrouvées ni du côté fléchi tendu, ni dans la partie non fléchie de la tige (figures 43e,o et 44e,o).

L'ensemble de ces résultats restent cependant préliminaires étant donné le faible nombre de plantes observées et nécessitent d'être confirmés.

3.4- Effet de la surexpression de *PtaZFP2* sur l'expression de gènes candidats

Dans la littérature, les études menées jusqu'à présent ont mis en évidence l'implication de différents gènes dans les réponses aux sollicitations mécaniques (Braam, 2005 ; Lee *et al.*, 2005). Notre attention s'est portée sur les gènes mécanosensibles les mieux décrits. Parmi ces gènes, les gènes *TOUCH* (*TCH2*, *TCH3* et *TCH4*) dont l'expression est fortement induite par une sollicitation mécanique chez *A. thaliana* (Braam et Davis, 1990; Xu *et al.*, 1995) et chez le peuplier (Martin *et al.*, 2009) sont apparus comme des candidats intéressants. Il en est de même pour le gène *PtaACS6* codant l'une des isoformes de l'ACC synthase impliquée dans la biosynthèse de l'éthylène et qui est induit suite à une sollicitation mécanique chez *Vigna*

Figure 43 : Coupes transversales de tiges de peupliers non transformés soumises à des flexions multiples.

Les plantes ont été traitées pendant 1 mois avec 5µM de β -œstradiol. Deux semaines après le début du traitement, les plantes ont subi 6 flexions, 2 flexions espacées de 24h sont réalisées successivement, puis 3 jours séparent chaque série de 2 flexions. Les fragments de tiges ont été récoltés 3 jours après la dernière flexion, sur une même plante, dans une zone non sollicitée de la tige située 20 cm au-dessus du collet (a-e), dans la zone sollicitée du côté du tube (f-j) ou du côté opposé au tube (k-o). Les flexions sont réalisées 10 cm au-dessus du collet.

Les coupes ont été colorées au bleu de toluidine (a, b, f, g, k, l) ou par la safranine-bleu astra (c, d, e, h, i, j, m, n, o). Les images b, g, et l sont respectivement les agrandissements de la zone cambiale des images a, f et k. Les images d-e, i-j et n-o sont respectivement les agrandissements au niveau du xylème des images c, h et m.

bf : bois de flexion, cg : couche gélatineuse, f : fibre, m : moëlle, pc : parenchyme cortical, ph : phloème, rx : rayon xylémien, scl : sclérenchyme, vx : vaisseaux xylémien, xy : xylème, zc : zone cambiale.

Zone non
sollicitée

Zone fléchie
côté compressé

Zone fléchie
côté tendu

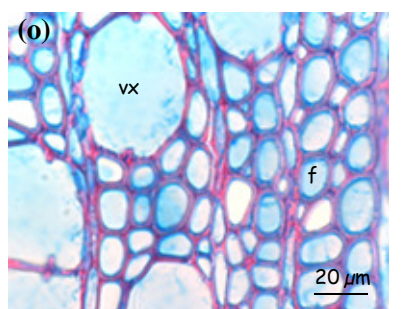
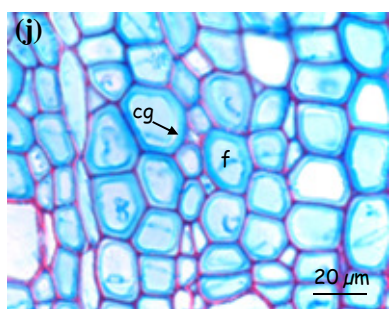
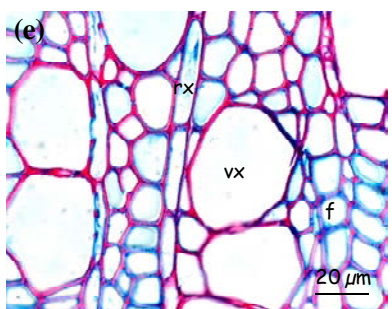
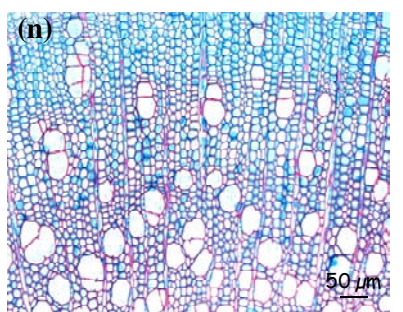
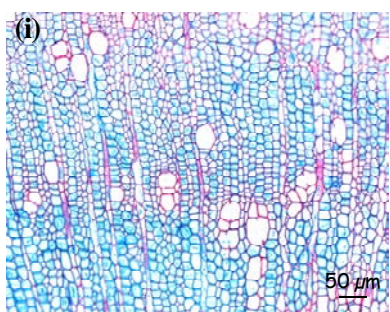
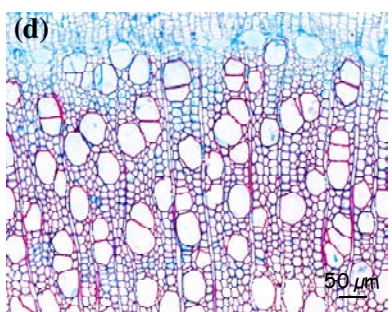
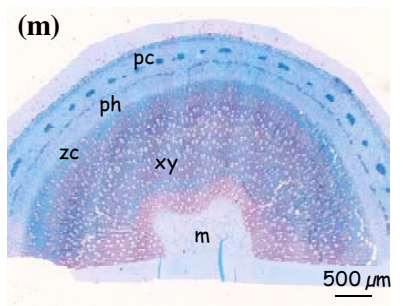
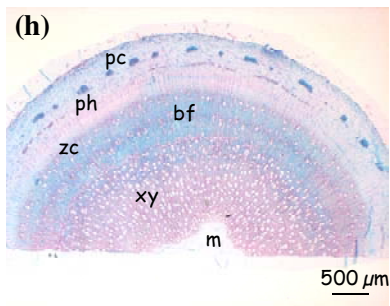
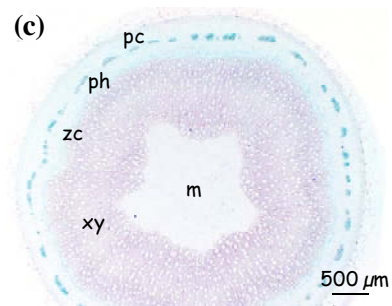
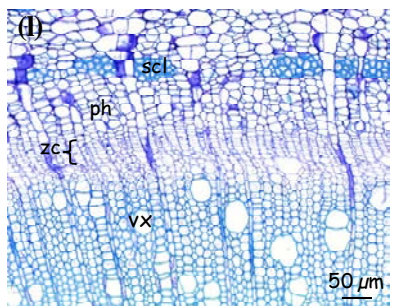
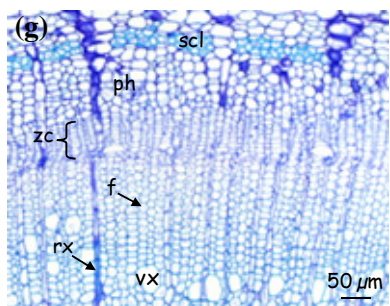
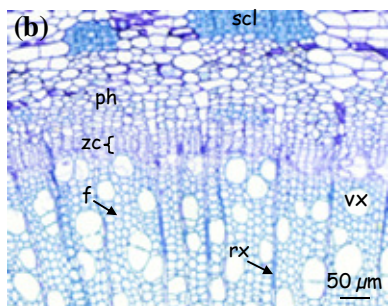
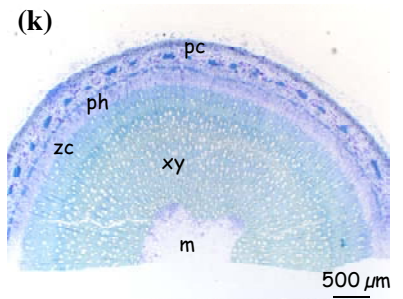
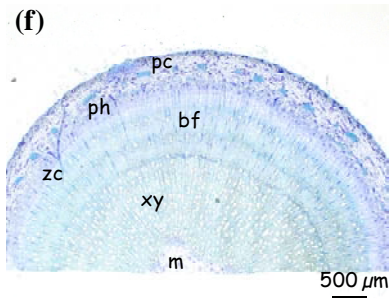
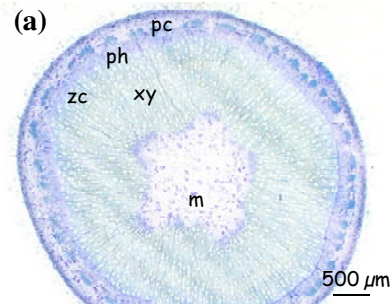


Figure 44 : Coupes transversales de tiges de peupliers transformés surexprimant *PtaZFP2* (lignée A49) soumises à des flexions multiples.

Les plantes ont été traitées pendant 1 mois avec 5µM de β-œstradiol. Deux semaines après le début du traitement, les plantes ont subi 6 flexions, 2 flexions espacées de 24h sont réalisées successivement, puis 3 jours séparent chaque série de 2 flexions. Les fragments de tiges ont été récoltés 3 jours après la dernière flexion, sur une même plante, dans une zone non sollicitée de la tige située 20 cm au-dessus du collet (a-e), dans la zone sollicitée du côté du tube (f-j) ou du côté opposé au tube (k-o). Les flexions sont réalisées 10 cm au-dessus du collet.

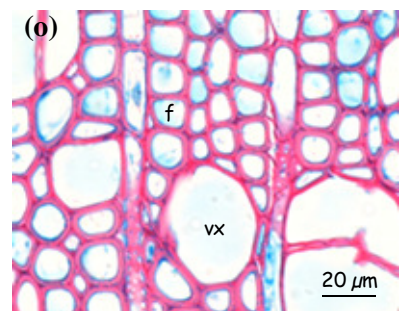
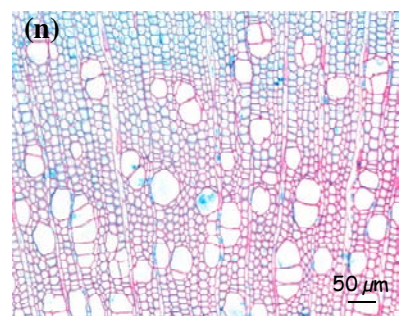
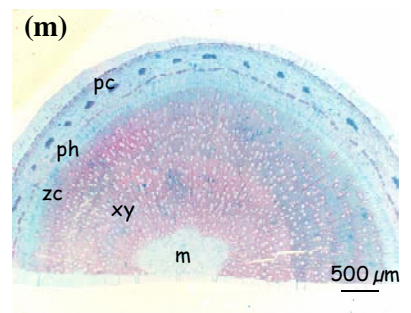
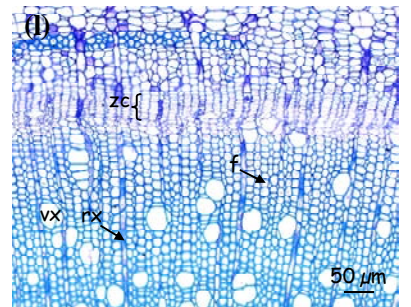
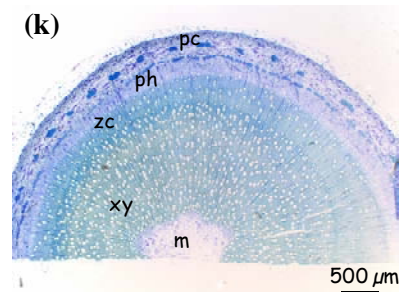
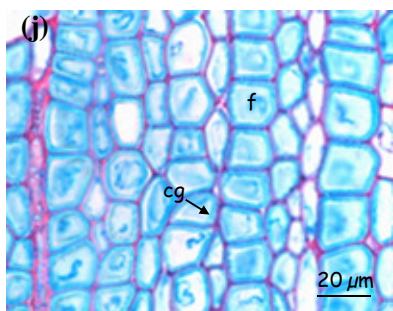
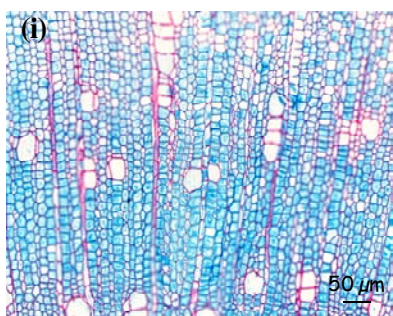
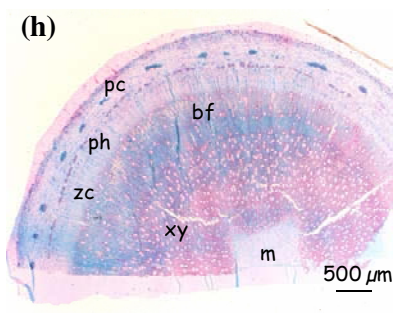
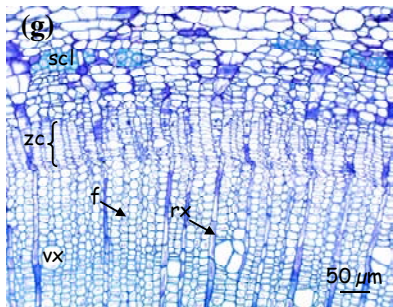
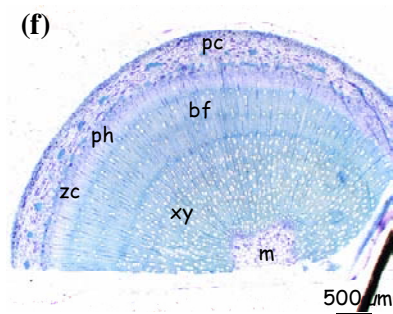
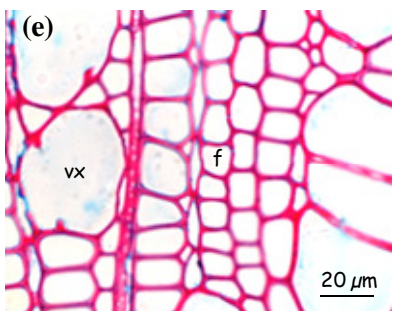
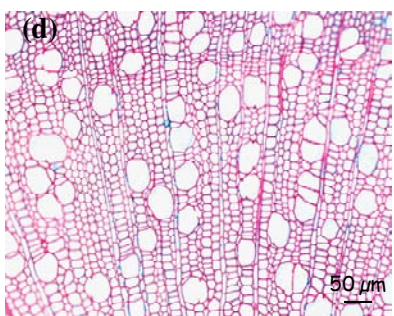
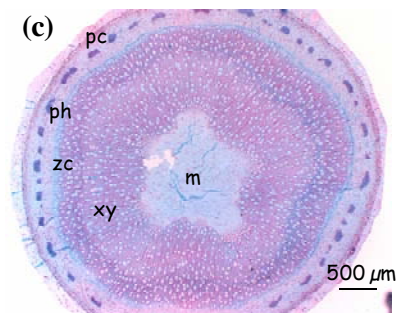
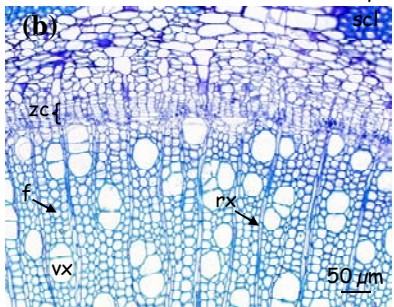
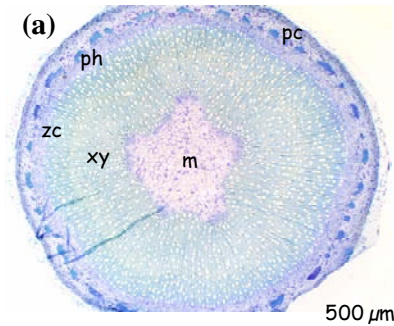
Les coupes ont été colorées au bleu de toluidine (a, b, f, g, k, l) ou par la safranine-bleu astra (c, d, e, h, i, j, m, n, o). Les images b, g, et l sont respectivement les agrandissements de la zone cambiale des images a, f et k. Les images d-e, i-j et n-o sont respectivement les agrandissements au niveau du xylème des images c, h et m.

bf : bois de flexion, cg : couche gélatineuse, f : fibre, m : moëlle, pc : parenchyme cortical, ph : phloème, rx : rayon xylémien, scl : sclérenchyme, vx : vaisseaux xylémien, xy : xylème, zc : zone cambiale.

Zone non
sollicitée

Zone fléchie
côté compressé

Zone fléchie
côté tendu



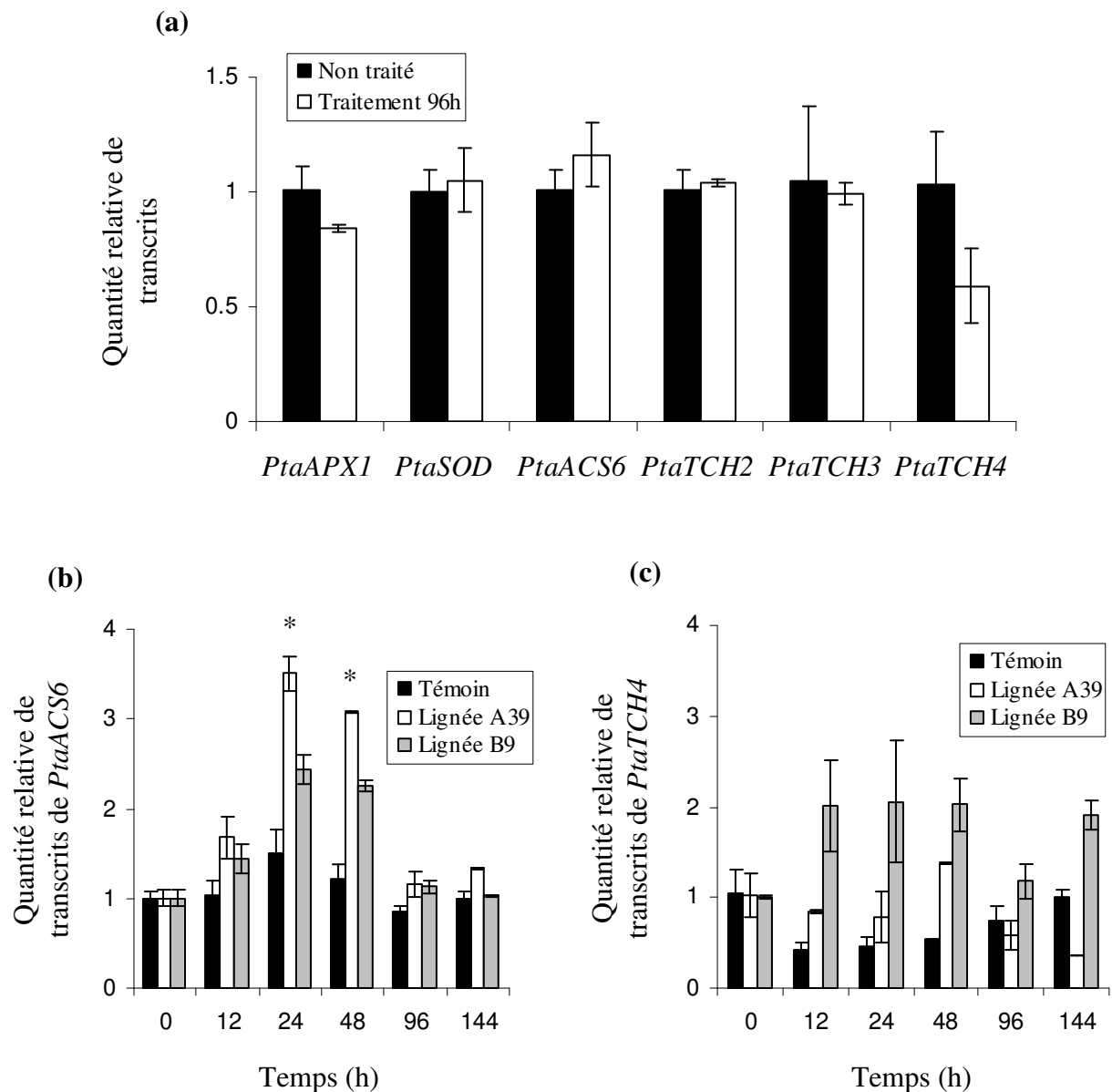


Figure 45 : Effet de la surexpression de *PtaZFP2* sur l'expression de gènes candidats.

Le 17 β -œstradiol a été ajouté dans la solution nutritive à 5 μ M finale. Les ARNs totaux ont été extraits sur des fragments de tiges de 5 cm de plantes non traitées ou récoltées 96h (a) ou 12h, 24h, 48h, 96h, 144h (b,c) après le traitement. (a) Les quantités relatives de transcrits des gènes *PtaAPX1*, *PtaSOD*, *PtaACS6*, *PtaTCH2*, *PtaTCH3* et *PtaTCH4* ont été obtenues par PCR quantitative en temps réel à partir de la lignée A39 transformée avec *PtaZFP2*. (b,c) Les quantités relatives de transcrits des gènes *PtaACS6* et *PtaTCH4* ont été obtenues par PCR quantitative en temps réel à partir de la lignée non transformée (témoin), d'une lignée transformée avec *PtaZFP2* (lignée A39) et d'une lignée transformée avec *JrZFP2* (B9). Les résultats représentent les valeurs moyennes obtenues à partir de 2 plantes (\pm ES). Les astérisques (*) représentent une différence significative à $P < 0.05$ (test de Student).

radiata (Botella *et al.*, 1995) et chez le peuplier (Martin *et al.*, 2009). Par ailleurs, les travaux de Rizhsky *et al.* (2004) chez *A. thaliana* ont montré l'implication de ZAT12, protéine présentant la plus forte homologie avec PtaZFP2, dans l'expression du gène *APX1* (*ascorbate peroxidase 1*) codant une enzyme de la voie oxydative. Les espèces activées de l'oxygène étant impliquées lors des réponses aux sollicitations mécaniques, nous avons testé l'effet de la surexpression de *PtaZFP2* sur l'expression de deux gènes intervenant dans la réponse au signal oxydatif, *PtaAPX* et *PtaSOD*.

La cinétique d'expression des transgènes en présence de 17 β -œstradiol ayant montré que la surexpression de *PtaZFP2* était la plus élevée 96h après le traitement, nous avons réalisé une première analyse à ce temps donné. Les résultats présentés figure 45a montrent que, 96h après le traitement, la surexpression de *PtaZFP2* (lignée A39) n'induit pas de modification du niveau d'expression des gènes *PtaAPX1*, *PtaSOD*, *PtaACS6*, *PtaTCH2*, *PtaTCH3*, *PtaTCH4*. Une étude menée sur la cinétique globale montre cependant une induction statistiquement significative de l'expression du gène *PtaACS6*. De manière surprenante, cette induction est transitoire et se manifeste de 24 à 48h après le traitement, aussi bien dans la lignée A39 qui surexprime *PtaZFP2* que dans la lignée B9 surexprimant *JrZFP2* (figure 45b). Pour *PtaTCH4* aucune différence statistique n'est observée entre les plantes sauvages et les plantes transformées (figure 45c).

Parmi les voies de signalisation connues des signaux mécaniques, l'expression de *PtaZFP2* semblerait donc avoir une action sur celle conduisant à la synthèse d'éthylène *via* une augmentation de l'expression de *PtaACS6*.

IV- Discussion

4.1- Production de plantes transgéniques et efficacité des cassettes d'expression

Pour produire les plantes transgéniques nécessaires à nos travaux, nous avons utilisé un protocole de transformation génétique qui avait déjà été éprouvé à plusieurs reprises chez le peuplier (Leplé *et al.*, 1992). Ce type de transformation n'ayant encore jamais été effectuée au laboratoire, et afin de pouvoir l'utiliser en routine, je suis allé acquérir la technique dans l'équipe de Gilles Pilate au sein de l'Unité Amélioration Génétique et Physiologie Forestières de l'INRA d'Orléans. Les transformations réalisées avec les vecteurs pX7 et PMDC7 ont permis la régénération de 18 à 24 lignées à partir des 45 explants de départ. Le taux de régénération obtenu, compris entre 40% et 53% est proche de celui obtenu par Leplé et ses collaborateurs (1992). Grâce à la technique utilisée nous avons obtenu un nombre suffisant de lignées pour pouvoir réaliser notre étude.

Au commencement de ces expériences, nous avons choisi d'utiliser un vecteur permettant une expression constitutive des transgènes (pHg8) et deux vecteurs inductibles par les œstrogènes (pX7 et PMDC7). L'impossibilité de régénérer le moindre cal à partir des transformations utilisant le vecteur pHg8, nous a confortés dans le choix des constructions inductibles. Cependant, les vecteurs que nous avons choisis avaient été testés uniquement chez *A. thaliana* et chez le tabac, c'est-à-dire des plantes non ligneuses. La première partie de nos travaux a donc consisté à vérifier et analyser leur fonctionnement au sein des peupliers que nous avons régénérés.

Les résultats obtenus montrent que les constructions utilisant le vecteur PMDC7 sont bien fonctionnelles chez le peuplier. De manière intéressante, comme pour les plantules d'*A. thaliana*, une faible dose d'œstradiol est suffisante pour induire l'expression du transgène. Contrairement aux résultats obtenus chez *A. thaliana* qui montraient un niveau d'expression équivalent pour des doses de 17 β -œstradiol comprises entre 5 et 50 μ M (Zuo *et al.*, 2000), chez le peuplier et dans nos conditions, la quantité relative de transcrits est augmentée de 1,3 à 2 fois entre 10 et 50 μ M d'œstrogènes. Ces résultats corroborent ceux obtenus par Curtis et ses collaborateurs en 2005. Au cours de leurs travaux, les plants d'*A. thaliana* surexprimant un gène codant la GA2-oxydase sous contrôle des œstrogènes, montraient un retard dans la

mise en place de l'anthèse. Cet effet, qui apparaît pour des concentrations inférieures à 4 μM , est particulièrement visible pour des doses supérieures à 40 μM , ce qui indique une variation de l'expression du transgène pour des doses d'œstrogènes de 4 à 40 μM .

Chez *A. thaliana*, la transcription des transgènes est induite dès 30 minutes après le traitement aux œstrogènes. Le maximum d'expression est observé 24h plus tard. L'expression diminue alors progressivement jusqu'à 96h pour retrouver un niveau deux fois moins important, identique à celui observé au bout de 12h (Zuo *et al.*, 2000). Dans nos conditions d'étude et pour les deux lignées testées, le niveau d'expression des transgènes présente une relative stabilité de 12h à 48h après le traitement au 17 β -œstradiol. Mais, contrairement aux résultats obtenus chez *A. thaliana*, une forte augmentation de la quantité relative de transcrits est ensuite observée après 96h de traitement. Cette variation peut s'expliquer par les différences entre les deux matériels utilisés, tant au niveau de la taille et du stade de développement (*A. thaliana* de deux semaines, peupliers de 40 cm) qu'au niveau du milieu de culture (hydroponie pour le peuplier, milieu gélosé pour *A. thaliana*). L'induction par les œstrogènes persiste au-delà de sept jours, indiquant une dégradation relativement lente du 17 β -œstradiol dans le milieu de culture que nous avons utilisé, ce qui nous a ainsi permis de limiter le nombre de traitements lors des expérimentations les plus longues.

La surexpression des transgènes dans tous les tissus testés a montré que, suite à l'absorption des œstrogènes par les racines, l'hormone circule *via* le xylème jusqu'aux différents organes. Toutefois, la forte induction du transgène dans les limbes par rapport aux autres tissus observés suggère une accumulation importante du 17 β -œstradiol dans cette partie de la plante.

Une analyse précise de l'expression des transgènes, dans les plantes surexprimant *PtaZFP2* ou *JrZFP2* et présentant une seule insertion de la construction, a montré des différences importantes du niveau d'induction entre les lignées. Si certaines lignées présentent une quantité de transcrits seulement 30 fois supérieure aux témoins non traités, chez d'autres, le niveau d'induction est de 200 à 300 fois supérieur au témoin. Ces différences d'expression entre lignées peuvent s'expliquer par la position du transgène dans le génome. Les quantités relatives de transcrits observées dans les lignées présentant le niveau d'expression le plus élevé sont comparables à celles observées suite à une sollicitation mécanique avec des sommes de déformations standardisées aux alentours de 1% (chapitres 2 et 3).

En conclusion, la cassette de surexpression du vecteur PMDC7 inductible par les œstrogènes présente un fonctionnement très proche chez les espèces herbacées et chez les

espèces ligneuses. Le niveau d'expression des transgènes ainsi que la durée de l'induction font de ce vecteur un matériel adapté à notre étude.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons produit des lignées RNAi à l'aide du vecteur pX7, également inductible par les œstrogènes. Lors du criblage fonctionnel des différentes lignées régénérées, nous avons réalisé un ou plusieurs traitements au 17 β -œstradiol sur des plantes mesurant 10 à 15 cm de haut et cultivées en hydroponie. Quelque soit le nombre de traitements, les résultats ne montrent aucune différence entre les plantes sauvages et les plantes transformées. Chez *A. thaliana*, le fonctionnement de ce vecteur a été montré sur des lignées transformées surexprimant constitutivement un transgène de GFP (Guo *et al.*, 2003). L'extinction du gène chez les plantes cultivées en présence d'œstrogènes a été mise en évidence tant au niveau moléculaire (absence de transcrit de GFP), qu'au niveau physiologique (absence de fluorescence). Comme décrit dans l'introduction de ce chapitre, ce système d'expression nécessite au préalable une recombinaison entre les différentes parties de la construction. Or, dans nos lignées, la recombinaison est partielle. Ceci peut expliquer la non extinction du gène *PtaZFP2* endogène. Soit le niveau d'ARNdb d'intérêt produit est insuffisant, soit ces plantes sont chimériques (certaines cellules produisent des ARNdb et d'autres non) et donc difficiles à analyser. Dans le cas d'*A. thaliana*, les graines ont été mises à germer directement sur milieu contenant du 17 β -œstradiol (Guo *et al.*, 2003). Le traitement plus tardif de nos peupliers (10 à 15 cm de hauteur) peut expliquer les différences que nous avons pu observer quant à la recombinaison partielle des constructions. Des essais de multiplication sur un milieu gélosé contenant 2 μ M de 17 β -œstradiol doivent être réalisés pour tenter de palier ce problème de recombinaison.

4.2- Rôle de *PtaZFP2* dans la croissance des plantes et dans la réponse aux sollicitations mécaniques

Les différents travaux que nous avons réalisés nous ont permis de montrer (i) que le gène *PtaZFP2* présente une induction rapide et transitoire suite à une sollicitation mécanique de type flexion, (ii) que son expression est corrélée à la somme des déformations longitudinales subies par la plante, mais aussi (iii) que son niveau d'expression varie suivant la fréquence de sollicitation mécanique. Cependant, son rôle précis dans la réponse des plantes aux sollicitations mécaniques n'a pas pu être montré.

4.2.1- Un rôle important dans les premières étapes du développement ?

Des premiers éléments de réponse sur le rôle de *PtaZFP2* dans le développement du peuplier sont apportés avec les essais de production de plantes transgéniques pHg8 RNAi permettant une extinction ciblée constitutive du gène. En effet, lors des trois essais de transformation réalisés avec cette construction, aucune plantule n'a pu être régénérée, aucun cal vert n'étant apparu sur le milieu sélectif. Ce résultat pourrait s'expliquer par une absence d'insertion du T-DNA portant le gène de résistance lors de la transformation des peupliers. Toutefois, cette explication est peu probable car les transformations réalisées en parallèle, avec les autres constructions et dans des conditions identiques, ont toutes permis la formation de cals ainsi que la régénération de plantes transformées. La seule différence est la présence du promoteur CaMV 35S qui entraîne l'expression du transgène durant toutes les étapes de la transformation. L'inhibition spécifique de l'expression de *PtaZFP2* par les constructions pHg8 RNAi Spe empêcherait la néo formation de plantes transgéniques. Ces observations rappellent les problèmes de létalité rencontrés chez *A. thaliana* avec des constructions surexprimant le gène *STZ* (ou *ZAT10*) codant une protéine C2H2-ZFP (Sakamoto *et al.*, 2004), ou encore l'incapacité de germer des graines de la génération T1 de plants ZAT6 RNAi d' *A. thaliana* (Devaiah *et al.*, 2007).

Au sein d'un massif cellulaire, les couches superficielles sont soumises à des sollicitations mécaniques internes importantes. Ceci est dû au fait que les cellules sont fortement liées entre elles *via* leurs parois cellulodiques sur lesquelles s'exerce une pression de turgescence (Schopfer, 2006). Récemment, des études réalisées au niveau du méristème apical d'*A. thaliana* ont montré que l'orientation des microtubules joue un rôle important dans la géométrie des cellules et dans la morphogenèse du méristème apical (Hamant *et al.*, 2008). Suite à l'ablation de certaines cellules de ce méristème, entraînant une modification des sollicitations mécaniques, les auteurs ont démontré que les microtubules s'orientent alors en direction de la tension maximale exercée sur une cellule. Ces travaux établissent donc un lien entre la morphogenèse, l'orientation des microtubules et les signaux mécaniques (Hamant *et al.*, 2008). Or, la régénération de plantes transgéniques à partir de cals nécessite la formation et l'organisation d'un méristème organogénétique au sein du massif cellulaire. Les cellules contenant les constructions pHg8 RNAi, altérées dans leur réponse aux signaux mécaniques, seraient alors incapables de former des cals.

L'impossibilité de régénérer des cals présentant une inhibition de l'induction de *PtaZFP2* pourrait mettre en évidence son importance dans la réponse cellulaire des plantes

aux signaux mécaniques. De plus, différentes études menées jusqu'à présent ont montré l'importance du rôle des facteurs de transcription de ce type non seulement dans les réponses aux stress, mais aussi lors des étapes précoces du développement (Ciftci-Yilmaz et Mittler, 2008).

4.2.2- La surexpression de *PtaZFP2* entraînerait une diminution de la croissance longitudinale et une modification des propriétés mécaniques des tiges

L'étude de la croissance des plantes surexprimant *PtaZFP2* ou *JrZFP2* n'a pas montré d'effet d'une surexpression permanente de ces deux gènes au niveau de la réponse de croissance en diamètre que ce soit en absence de toute sollicitation mécanique ou suite à une flexion transitoire. Par contre, une diminution significative de 11,6% de la croissance en hauteur est observée pour la lignée A30 surexprimant *PtaZFP2*. Des réponses de croissance du même ordre de grandeur ont déjà été observées avec des plantes d'*A. thaliana* surexprimant des protéines C2H2-ZFP (Sakamoto *et al.*, 2004 ; Vogel *et al.*, 2005). Ainsi, la surexpression du gène *ZAT10* se traduit, chez certains transformants, par une diminution d'environ 20% de la biomasse par rapport aux plantes sauvages (Mittler *et al.*, 2006). Les racines de plantes surexprimant *ZAT7* présentent une augmentation de leur longueur supérieure de 20 à 30% par rapport à celles de plantes sauvages en condition de stress froid (Ciftci-Yilmaz *et al.*, 2007). Comme dans notre étude, les différents travaux menés par ces auteurs présentent de fortes disparités de réponse entre les lignées transformées, pouvant être liées au niveau d'expression du transgène (Mittler *et al.*, 2006).

La réponse morphologique classique des plantes suite à une sollicitation mécanique se caractérise par une diminution de la croissance en hauteur, et chez certaines espèces, par une stimulation de la croissance en diamètre (Jaffe et Forbes, 1993 ; Telewski et Pruyn, 1998). Nos travaux suggèrent que *PtaZFP2* interviendrait uniquement dans la modification de la croissance en longueur. En réponse à une flexion, l'induction de l'expression de *PtaZFP2* étant cantonnée à la zone sollicitée (Martin *et al.*, 2009), les résultats de croissance observés avec les plantes transgéniques sont assez surprenants et suggèrent que ce gène serait en amont d'un signal migrant jusqu'aux zones en croissance. Toutefois, dans ces plantes transgéniques, l'expression de *PtaZFP2* est ectopique et ce phénotype pourrait ne pas être lié directement à son rôle dans la réponse aux sollicitations mécaniques.

Après deux mois de surexpression de *PtaZFP2*, nous avons pu observer une variation significative du module d'élasticité dans la partie basale des tiges. Comme pour la réponse de croissance en longueur, la variation du module d'élasticité reste relativement faible (11,3% plus élevé chez le surexprimant). Cette différence des propriétés mécaniques des tiges et notamment du module de Young peut s'expliquer par une modification de la nature et de la taille des différents tissus chez les plantes A30 surexprimant *PtaZFP2*. Les observations anatomiques des tiges ont mis en évidence la présence d'un bois particulier dans la zone fléchie de la tige, préalablement nommé « bois de flexion » par Kern et ses collaborateurs. (2005). Ce bois, caractérisé par un nombre plus élevé de fibres, est probablement à l'origine d'une rigidité plus importante de la tige dans cette zone. Cependant, aucune différence anatomique n'a pu être observée entre des tiges de plantes sauvages et celles surexprimant *PtaZFP2* après un mois de traitement aux œstrogènes. Cette absence de modification visible des tissus sur les coupes peut s'expliquer par une durée de traitement au 17 β -œstradiol plus courte que lors de l'étude des propriétés mécaniques. Pour vérifier les résultats, de nouvelles coupes doivent être réalisées. Toutefois, les propriétés mécaniques d'un tissu dépendent aussi de l'épaisseur des parois et de l'orientation des microfibrilles de cellulose au sein de ces parois. Au cours de nos travaux, nous n'avons pas pu vérifier ces caractéristiques structurales.

D'après ces résultats préliminaires, *PtaZFP2* interviendrait dans la modification de la croissance primaire des plantes, mais aussi dans la modification des propriétés mécaniques des tiges. Ces modifications physiologiques suggèrent que les plantes surexprimant *PtaZFP2* présenteraient une meilleure résistance aux sollicitations mécaniques. En effet, une diminution de la croissance primaire de la tige diminue sa prise au vent et l'augmentation de la rigidité de la tige augmente sa résistance à la flexion. Pruyn et ses collaborateurs (2000) ont ainsi décrit deux stratégies différentes de réponse à des flexions multiples pour deux peupliers hybrides. Ainsi, pour l'un des hybrides, des flexions multiples déclenchent une diminution de la croissance longitudinale des plantes. Pour l'autre hybride, une augmentation de la rigidité des tiges, liée à une augmentation de la croissance secondaire, est observée.

4.2.3- Un rôle dans la régulation de l'expression d'autres gènes induits suite aux sollicitations mécaniques ?

La surexpression de *PtaZFP2* entraîne une augmentation transitoire de la quantité de transcrits de *PtaACS6* (enzyme impliquée dans la biosynthèse de l'éthylène). Les résultats concernant le rôle de l'éthylène dans la croissance (Pierik *et al.*, 2007) ainsi que dans la

réponse aux stress mécaniques (Johnson *et al.*, 1998) sont contradictoires. Toutefois, une étude récente, sur des tabacs insensibles à l'éthylène, montre que cette hormone aurait un rôle dans l'allocation de la biomasse en réponse au stress mécanique (Anten *et al.*, 2006). Dans notre cas, la diminution de croissance observée chez les plantes surexprimant *PtaZFP2* pourrait donc être en partie expliquée par une induction de l'expression de *PtaACS6*. Cependant, il semble que l'éthylène n'affecte pas les propriétés élastiques des tiges des plants de tabac (Anten *et al.*, 2006), alors que les plantes surexprimant *PtaZFP2* présentent une augmentation du module de Young. Les résultats suggèrent que *PtaZFP2* n'agirait donc pas exclusivement sur l'expression de *PtaACS6*.

Le gène *PtaZFP2* codant putativement un facteur de transcription, nous avons étudié son effet sur l'expression d'autres acteurs de la réponse mécanique. Aucune variation de l'expression des gènes *TCH* codant des CaMs ou des CMLs (*PtaTCH2* et *PtaTCH3*) n'a été observée dans les plantes transgéniques. De même, l'expression de *PtaTCH4*, codant une xylogucane endotransglycosylase, ne semble pas être modifiée par la surexpression de *PtaZFP2*. Des résultats identiques ont été obtenus avec les gènes *PtaAPX* et *PtaSOD* codant des enzymes impliquées dans la réponse oxydative (Gechev *et al.*, 2006). Concernant l'implication de protéines C2H2-ZFP dans le stress oxydatif, des premiers travaux utilisant des mutants d'*A. thaliana* ont montré l'intervention de ZAT12 dans l'expression du gène *APX1* (Rizhsky *et al.*, 2004). Cependant, chez les plantes surexprimant ZAT12, aucune modification de l'expression du gène *APX1* n'est observée (Davletova *et al.*, 2005). Les auteurs concluent que la relation entre ZAT12 et *APX1* est complexe et nécessite probablement l'intervention d'autres acteurs. Dans le cadre de notre étude, il aurait également été judicieux d'étudier l'expression de ces différents gènes suite à une flexion, c'est-à-dire dans un contexte où les partenaires moléculaires potentiels de *PtaZFP2* sont présents.

Toutefois, cette approche « gènes candidats » visant à rechercher les gènes sous contrôle de *PtaZFP2* est très préliminaire, sachant que chez *A. thaliana*, 760 gènes présentent une expression modifiée 30 minutes après l'application d'une sollicitation mécanique (Lee *et al.*, 2005).

4.3- Perspectives

L'analyse bioinformatique de la séquence protéique de *PtaZFP2* a mis en évidence une homologie assez forte avec certaines protéines d'*A. thaliana* (ZAT11 et ZAT12), du pétunia

(ZPT2-12), et de *Catharanthus roseus* (ZCT1) notamment (Martin *et al.*, 2009). Les études qui ont été menées sur ces gènes ont montré leur implication dans différentes voies. Chez *A. thaliana*, la surexpression du gène *ZAT12* augmente la tolérance des plantes au stress oxydatif (Rizhsky *et al.*, 2004). D'autres protéines C2H2-ZFP *ZAT7* et *ZAT10* sont également impliquées dans la réponse au stress oxydatif (Mittler *et al.*, 2006). Il serait donc intéressant de tester la tolérance des plantes surexprimant *PtaZFP2* aux espèces activées de l'oxygène (EAO). Des résultats obtenus par cotransformation de cellules de *Catharanthus roseus* avec des constructions surexprimant le gène *ZPT1* et des constructions contenant la séquence promotrice de deux gènes de la voie de biosynthèse des alcaloïdes ont montré l'implication de ce gène dans la répression des gènes codant la strictosidine synthase (STR) et la tryptophane décarboxylase (TDC) (Pauw *et al.*, 2004). Une étude de l'effet de la surexpression de *PtaZFP2* sur l'expression de gènes de la biosynthèse des alcaloïdes pourrait également être intéressante à mener.

L'expression de *PtaZFP2* est induite par différents stress abiotiques tels que des stress salin et froid ou des blessures (Martin *et al.*, 2009). Différents travaux ont mis en évidence l'implication de protéines C2H2-ZFP dans la réponse à ces stress. Ainsi, une étude menée chez *A. thaliana* a permis de mettre en évidence que la protéine STZ (salt tolerance zinc finger) conférait une tolérance accrue aux sels, LiCl et NaCl, à des levures (Lippuner *et al.*, 1996). En 2001, Kim et ses collaborateurs ont montré qu'une expression constitutive du gène *SCOF-1* codant une protéine à deux doigts de zinc de type C2H2-ZFP induisait une tolérance accrue des plants d'*A. thaliana* au froid. Connaissant ceci, une étude sur la réponse physiologique des lignées de surexpression suite à des stress salins ou froid pourrait être menée afin de mettre en évidence une variation potentielle de la sensibilité des plantes transformées.

A part une étude sur la réponse de croissance en diamètre et une première analyse anatomique de tiges, nous n'avons réalisé que peu d'analyses des plantes transgéniques suite à des flexions. Or, dans la plupart des études menées sur des plantes transformées surexprimant une protéine C2H2-ZFP, le phénotype n'est détecté qu'après application d'un stress. La réalisation d'autres études sur la réponse des lignées de surexpression à une sollicitation mécanique pourrait permettre de mettre en évidence un phénotype particulier. Compte tenu des résultats présentés dans le chapitre 3, il serait également intéressant d'étudier le comportement de ces plantes en réponse à des sollicitations multiples.

Enfin, des travaux visant à résoudre les problèmes rencontrés avec les lignées RNAi sont actuellement en cours, notamment en essayant de multiplier les plantes sur milieu contenant du 17β -œstradiol. L'utilisation de ces plantes pourrait nous permettre d'appréhender l'importance de *PtaZFP2* en réponse à une sollicitation mécanique de type flexion.

Discussion générale et perspectives

Temps après l'application de la sollicitation	Réponses cellulaires	Réponses de croissance
1 à 10 s	Formation d'un potentiel d'action Ouverture des canaux mécano-sensibles	
1 à 2 min	Entrée de Ca^{2+} dans le cytosol Production d'espèces activées de l'oxygène Blocage du transport phloémien	
2 à 8 min	Expression des gènes <i>PtaZFP2</i> codant une protéine C2H2-ZFP et <i>PtaTCH2</i> codant une CML	Arrêt de la croissance en diamètre et de la croissance longitudinale
10 à 30 min	Expression de gènes codant des calmodulines (gènes <i>TOUCH</i>) chez <i>A. thaliana</i> Expression de gènes de la biosynthèse de l'éthylène (<i>ACC synthase</i>) chez <i>Vigna radiata</i> Expression du gène <i>JrZFP2</i> codant une protéine C2H2-ZFP chez <i>Juglans regia</i>	
30 min	Modification de l'expression de gènes codant des protéines du métabolisme	
30 à 60 min		Reprise progressive de la croissance longitudinale
1 à 2 h	Retour à l'expression de base des gènes <i>TOUCH</i> , <i>ACS6</i> , <i>JrZFP2</i> et <i>PtaZFP2</i>	
4 à 6 h		Reprise de la croissance en diamètre et augmentation de la division cellulaire au niveau du
8 à 12 h		Retour à une croissance longitudinale normale

Figure 46 : Cinétique des réponses cellulaires et physiologiques observées suite à une sollicitation mécanique.

Les éléments apportés par notre étude sont mentionnés en rouge.

Cette partie reprend les points les plus importants des résultats et des discussions fournis dans les quatre chapitres de la partie précédente en intégrant l'ensemble des résultats obtenus au cours de la thèse. Pour chacun des thèmes abordés, des perspectives à plus ou moins long terme sont proposées.

I- Les réponses physiologiques et moléculaires du peuplier suite à une flexion transitoire

Comme il a été évoqué dans la synthèse bibliographique, la cinétique des réponses aux sollicitations mécaniques, ainsi que le lien entre les différents acteurs de ces réponses, ne sont pas encore totalement élucidés. Toutefois, les travaux effectués au cours de cette thèse permettent d'étoffer la cinétique proposée par Telewski en 2006 (figure 46).

1.1- Les réponses de croissance

Aucune étude cinétique concernant l'augmentation de la croissance en diamètre suite à une sollicitation mécanique unique n'avait été réalisée auparavant. D'après les résultats présentés dans le deuxième chapitre, une flexion transitoire de la tige de jeunes peupliers induit un arrêt rapide de leur croissance en diamètre pendant environ 4h. Celui-ci est ensuite suivi par une forte augmentation de la croissance secondaire pendant plusieurs jours (4.8 ± 2.7 jours selon les plantes). La reprise de croissance observée au bout de 4h chez le peuplier est en accord avec les résultats obtenus par Biro et ses collaborateurs (1980). En effet, chez *Phaseolus vulgaris*, une augmentation de la largeur de la zone de division cellulaire au niveau du cambium est observée 6h après l'application d'une sollicitation mécanique sur des entre-nœuds. La réponse des plantes aux sollicitations mécaniques ayant également un impact sur la croissance primaire, il aurait été intéressant de connaître la cinétique de cette réponse de croissance chez le peuplier. Une telle étude, réalisée chez la tomate, a montré qu'une flexion de la tige provoque un arrêt rapide de la croissance primaire (8.3 ± 3.7 min après la réalisation de la flexion) pendant environ 1h, suivi par un retour progressif à une vitesse d'allongement identique à celle du témoin au bout de 10h en moyenne (Coutand *et al.*, 2000). La réponse de croissance longitudinale semble durer moins longtemps que la réponse de croissance en

diamètre observée chez le peuplier. Cependant, les résultats ayant été obtenus sur deux espèces différentes, ces cinétiques restent difficilement comparables.

Pour pouvoir mettre en évidence d'éventuels mécanismes communs aux deux réponses, il faudrait pouvoir comparer précisément les deux cinétiques de réponse de croissance de la partie aérienne au sein d'une même espèce. Cette étude n'a pas été réalisée au cours de cette thèse car le peuplier présente une élongation avec des mouvements de circumnutation et le dispositif expérimental mis en place pour étudier la croissance longitudinale de la tige de tomate n'était pas adapté (Coutand *et al.*, 2000). Chez le peuplier, les mesures de croissance longitudinale nécessitent donc de modifier le système de mesure existant.

1.2- Les acteurs moléculaires

En ce qui concerne les acteurs moléculaires dont l'expression est modifiée par les sollicitations mécaniques, notre étude a permis de caractériser la cinétique d'expression des différents gènes mécanosensibles les mieux décrits dans la littérature au sein d'une même espèce, d'un même organe et en réponse à une même sollicitation mécanique. Ceci a donc permis de comparer leurs cinétiques d'expression. Pour certains d'entre eux (*PtaTCH2* et *PtaACS6*), une cinétique d'expression plus fine que celle déjà connue a même été obtenue. Ainsi, le gène *PtaTCH2* s'avère être induit dès 5 min après la flexion, dans des temps comparables aux premières réponses de croissance (Martin *et al.*, 2009). En ce qui concerne *PtaACS6*, la cinétique obtenue est la même que celle observée chez *Vigna radiata* (Botella *et al.*, 1995). Ce gène s'exprime plus tardivement que *PtaTCH2*. Nos travaux ont également permis de caractériser la cinétique fine d'expression du gène *PtaZFP2*, codant une protéine à deux doigts de zinc de type C2H2-ZFP. Le profil d'expression de ce gène est très comparable à celui de *PtaTCH2*. En effet, il présente une induction très précoce (dès 5 min) et un retour à un niveau de base entre 2 et 3h après la flexion.

Jusqu'à présent, aucun lien n'avait encore été mis en évidence entre les réponses de croissance des plantes et ces différents acteurs moléculaires. Les résultats présentés dans le chapitre 3 suggèrent que *PtaTCH2*, *PtaTCH4*, *PtaACS6* et *PtaZFP2* ne sont pas directement impliqués dans la réponse de croissance secondaire. En effet, à une fréquence de sollicitation d'une flexion par 24h, la croissance secondaire ne semble pas être modifiée au cours des trois premières flexions alors que le niveau d'induction de ces quatre gènes mécanosensibles est beaucoup plus faible dès la deuxième flexion. La mise en place du phénomène

d'acclimatation au niveau de la réponse de croissance ne semble pas être directement corrélée au niveau d'expression de ces quatre gènes suite à des flexions multiples.

Les résultats obtenus à partir de l'étude des peupliers transgéniques suggèrent, quant à eux, un rôle de *PtaZFP2*, comme facteur de transcription putatif, dans l'induction de *PtaACS6*. Cependant, nos travaux n'ont pas permis de déterminer la nature de la relation entre ces deux acteurs. Le temps d'induction relativement long de l'expression de *PtaACS6* suggère cependant une action indirecte de *PtaZFP2* sur l'expression du gène *PtaACS6* (chapitre 4).

Enfin, l'analyse bioinformatique du promoteur de *PtaZFP2* a révélé la présence de plusieurs boîtes de régulation par des facteurs connus (Martin *et al.*, 2009). En particulier, ce promoteur contient deux éléments *cis* décrits comme étant impliqués dans l'induction de la transcription de gènes par le calcium (Kazan, 2006). De plus, il a été montré, lors d'une approche transcriptomique réalisée chez *A. thaliana*, que le gène *ZAT10* codant une protéine de type C2H2-ZFP figure dans la liste des gènes induits par le calcium (Kazan, 2006). Ces données suggèrent que l'expression de *PtaZFP2* pourrait être induite suite à l'augmentation de calcium cytosolique provoquée par la sollicitation mécanique. Connaissant la séquence promotrice de *PtaZFP2*, la production de cellules de peuplier transformées avec des délétions successives du promoteur couplées à un gène de GFP (Green Fluorescent Protein) est actuellement en cours au laboratoire afin d'identifier les acteurs en amont de *PtaZFP2*. Chez *A. thaliana*, l'expression de 760 gènes est modifiée 30 min après l'application d'une sollicitation mécanique (Lee *et al.*, 2005). Les relations entre ces différents acteurs moléculaires au cours de la cascade de réponse à une sollicitation mécanique apparaissent donc difficiles à mettre en évidence.

II- La déformation : paramètre physique perçu par les plantes au cours des sollicitations mécaniques

2.1- Validation et généricité du modèle « somme des déformations » de la mécanoperception

En 2000, les travaux de Coutand et Moulia ont mis en évidence une forte corrélation entre la durée de la réponse de croissance primaire de tomates et la somme des déformations

appliquées. A partir des résultats obtenus, ils ont proposé un modèle intégratif de la mécanoperception.

Nos travaux montrent que ce modèle de mécanoperception s'applique à d'autres réponses mises en place lors de l'application d'une flexion, qu'elles soient macroscopiques ou cellulaires. Nous avons ainsi mis en évidence une corrélation linéaire entre la somme des déformations appliquées et la croissance en diamètre journalière maximale, mais aussi entre la somme des déformations et le niveau d'expression du gène *PtaZFP2* (chapitre 2). La corrélation entre la durée de la réponse longitudinale et la somme des déformations est logarithmique alors que dans le cas des deux réponses locales, cette relation est linéaire. Ceci peut être dû au fait que des mécanismes intermédiaires sont mis en place lors de la réponse longitudinale, alors que dans le cas de l'expression de *PtaZFP2* notamment, le nombre d'étapes entre la réaction primaire et la réponse est réduit.

Au cours d'expériences destinées à caractériser un phénomène d'acclimatation des plantes aux sollicitations mécaniques (chapitre 3), nous avons également étudié l'expression des gènes *PtaTCH2*, *PtaTCH4* et *PtaACS6* suite à une flexion. Dans ces expériences, la gamme de sommes de déformations standardisées appliquées était comprise entre 0.5 et 1%. Or, les résultats indiquent également une forte corrélation entre le niveau d'expression des gènes et la somme des déformations. Ces données montrent que le modèle proposé est valable pour l'ensemble des gènes mécanosensibles étudiés.

De plus, ce modèle de mécanoperception n'ayant été testé, jusqu'à présent, que sur la tomate, les résultats que nous obtenons sur le peuplier montrent que celui-ci s'applique aussi à différentes espèces végétales.

Enfin, ce modèle de mécanoperception semble pouvoir aussi expliquer l'intensité des réponses obtenues dans d'autres types de sollicitation mécanique telles que la gravité. Les seules études présentant une relation quantitative entre une sollicitation mécanique et des réponses physiologiques et moléculaires sont celles de Soga et ses collaborateurs (2006 et 2007) en condition d'hypergravité. Au cours de leurs travaux, ils ont mis en évidence une corrélation négative entre l'intensité du stimulus gravitationnel appliqué et l'allongement des épicotyles de haricot azuki ainsi qu'une corrélation positive entre l'intensité de l'hypergravité et la réponse de croissance en diamètre (Soga *et al.*, 2006). Au niveau moléculaire, ils ont montré une corrélation logarithmique entre l'intensité de l'hypergravité et l'inhibition de l'expression du gène *VaXTHS4* codant une xyloglucane endotransglucosylase/hydrolase (Soga *et al.*, 2007). L'hypergravité est une sollicitation mécanique qui induit une compression

des tissus proportionnelle à la masse de la plante divisée par le module de Young des tissus. Compte tenu de l'homogénéité probable des plantes (épicotyles de haricot azuki), le niveau de déformation des tissus était probablement proportionnel à l'intensité de l'hypergravité. Ces résultats suggèrent que, lors de l'hypergravité, la déformation est également la variable physique perçue par la cellule, déclenchant un signal proportionnel à son intensité. De manière intéressante, l'expression de *PtaZFP2* est modifiée en réponse à un stimulus gravitropique (Martin *et al.*, 2009). Ces résultats montrent qu'il existe des acteurs communs dans les réponses aux sollicitations mécaniques externes et internes. Comme suggéré par Telewski (2006), ces données plaident en faveur de l'existence d'un réseau unique de mécanoperception pour les différents types de signaux mécaniques (gravité, turgescence, vent...).

2.2- Différences de sensibilité des tissus à la déformation

Dans le modèle proposé par Coutand et Moulia (2000), l'équation $dS = k \cdot \epsilon \cdot dV$, définissant que chaque petit volume de tissu mécanoperceptif (dV) produit un signal proportionnel à sa déformation, fait intervenir une constante k . L'une des hypothèses sous-jacentes à ce modèle est que cette constante peut varier en fonction de la sensibilité des cellules à la sollicitation mécanique qu'elles subissent. Dans notre étude, les tiges de peuplier utilisées étant approximativement du même diamètre, la proportion de chaque tissu était probablement identique dans toutes les tiges (vérifiée par les coupes anatomiques dans le chapitre 4). Dans le modèle, nous avons donc calculé la somme des déformations sur l'ensemble de la zone sollicitée de la tige en considérant que la proportion de tissu mécanoperceptif était identique. Dans ces conditions et pour des petites déformations, l'expression de *PtaZFP2* et la croissance secondaire sont linéairement corrélées à la somme des déformations.

Toutefois, les différents tissus de la tige ne sont peut-être pas tous capables de percevoir la déformation et/ou d'y répondre. Disposant d'un acteur moléculaire primaire qui répond proportionnellement à la somme des déformations imposées, il serait maintenant intéressant de déterminer si il existe au sein de la tige, des différences de sensibilité à la déformation en fonction des tissus et donc des cellules. Pour cela, il faudrait pouvoir mesurer la réponse des différents tissus, calculer la somme des déformations pour chacun de ces tissus et voir si on obtient des courbes dose-réponse avec des paramètres différents.

Pour mesurer la réponse dans différents tissus, différentes stratégies sont possibles. L'une des possibilités envisagées était de suivre l'expression de *PtaZFP2* directement sur les tissus composant la tige par la technique d'hybridation *in situ*. Dans le cas du gène *PtaZFP2*, les différents essais réalisés avec cette technique n'ont pas été concluants car un signal était obtenu à la fois avec la sonde sens et avec la sonde antisens. Une production de peupliers transformés avec le promoteur de *PtaZFP2* couplé à un gène *GUS* pourrait être réalisée. Actuellement, nous envisageons de produire des anticorps dirigés contre *PtaZFP2* afin de repérer par immunolocalisation la protéine au sein des différents tissus avant et après une flexion.

III- Apport des résultats dans la compréhension de la croissance des plantes en conditions naturelles

En conditions naturelles, les plantes sont soumises en permanence à des stimuli mécaniques externes, induits notamment par le vent, de force et de fréquence variables. On peut se demander s'il existe des filtres, au sein des végétaux, leur permettant de modifier leurs réponses. Certaines sollicitations ne seraient alors pas perçues, par exemple des déformations trop faibles pour induire une réponse, des vitesses de déformation trop lentes ou trop rapides pour que les sollicitations soient perçues et/ou un phénomène de saturation du système de perception/réponse à des fréquences trop hautes. Les végétaux pourraient également s'acclimater au fur et à mesure des sollicitations.

3.1- Effet de l'intensité de la sollicitation

Les sommes de déformations que nous avons appliquées au cours de nos travaux présentent une large gamme de valeurs, elles couvrent donc très probablement toute la gamme de déformations pouvant exister en conditions naturelles. D'après nos résultats, le niveau d'expression des gènes mécanosensibles étudiés et la croissance secondaire des plantes augmentent proportionnellement avec l'intensité de la sollicitation appliquée. Il n'apparaît pas de seuil minimum de perception dans la gamme de déformation testée. Cependant, les sommes de déformation inférieures à 0.5% n'ont pas pu être testées car il est difficile, expérimentalement, d'appliquer de telles déformations.

3.2- Effet de la vitesse de sollicitation

Au cours de nos travaux, nous nous étions également interrogés sur l'effet de la vitesse de sollicitation sur la réponse de croissance. Durant cette thèse, nous avons étudié l'effet des deux vitesses les plus extrêmes que le système de flexion contrôlée nous permettait d'obtenir, soit 20 et 120 mm.min⁻¹, ainsi que celui d'une flexion manuelle correspondant à une vitesse proche de 1000 mm.min⁻¹. Les résultats obtenus indiquent que, dans la gamme testée, la réponse des plantes est la même quelle que soit la vitesse de sollicitation (données non montrées). Malgré tout, même la vitesse la plus rapide reste inférieure à celle que les plantes peuvent subir dans la nature. Ainsi, un vent de 3 m.s⁻¹ entraîne un déplacement à 6000 mm.min⁻¹ du haut de la tige de plants de luzerne (Py *et al.*, 2005). Etant donné que les vitesses appliquées étaient relativement faibles, on peut penser que, dans la nature, même les sollicitations les plus lentes sont perçues.

3.3- Effet de la fréquence de sollicitation

Dans le chapitre 3, nous montrons que l'application de flexions multiples modifie les réponses physiologiques et moléculaires des peupliers. Nous observons une diminution de la réponse moléculaire dès la deuxième flexion. En ce qui concerne la réponse de croissance en diamètre, on observe une modification de celle-ci seulement au bout de trois flexions quand la fréquence de sollicitation est d'une flexion par 24h. Quand les deux flexions sont espacées de quatre jours, la réponse de croissance est modifiée dès la deuxième flexion. Ces résultats suggèrent des temps d'acclimatation différents entre les premières réponses moléculaires et la réponse de croissance. Pour l'instant, nos travaux ne permettent pas de déterminer si ces modifications des réponses sont dues à une variation de la sensibilité au niveau de la perception ou à une variation des réponses précoces. De plus, on ne peut pas dire si l'acclimatation traduit une variation de la sensibilité ou une augmentation du seuil des stimulations perçues. Il serait donc intéressant de déterminer l'effet de la fréquence de sollicitation sur les valeurs des paramètres sensibilité et seuil des relations dose-réponse établies en utilisant le modèle de mécanoperception. Pour cela, il faudrait étudier les relations entre la somme des déformations et les réponses de la plante (croissance et expression de gènes) en fonction de la fréquence de sollicitation ; c'est-à-dire, pour une fréquence donnée, étudier les réponses de la plante dans une gamme de déformations imposées.

Si ces réponses sont dues à une altération de la sensibilité au niveau de la perception, ceci pourrait s'expliquer par une diminution de la sensibilité des mécanorécepteurs ou par une variation du nombre de ces récepteurs cellulaires. Parmi les récepteurs potentiellement impliqués dans la perception des signaux mécaniques se trouvent les canaux mécanosensibles de type MscS-like. De tels canaux ont été récemment identifiés chez *A. thaliana*, au niveau de la membrane des plastes (Haswell et Meyerowicz, 2006) puis au niveau de la membrane plasmique de cellules racinaires (Haswell *et al.*, 2008). Chez *E. coli*, ces canaux présentent un temps de relaxation extrêmement court compris entre 1 et 3 secondes (Hamill, 2006). Dans notre étude, les flexions successives étant séparées de 24h, cette période de désensibilisation des canaux ne peut pas expliquer nos résultats. La variation de sensibilité pourrait s'expliquer par une dégradation de ces canaux par endocytose après une sollicitation mécanique, ou bien par une inhibition de leur synthèse.

Les modifications des réponses suite à des sollicitations mécaniques multiples pourraient aussi être dues à des modifications structurales de certains constituants cellulaires comme la paroi qui tient une place importante dans le continuum CPMCW (Ingber 2003a et 2003b ; Telewski, 2006).

La réalisation de nouvelles expériences en diminuant le temps entre deux flexions afin d'étudier leurs effets sur l'expression des différents acteurs moléculaires pourrait permettre de tester ces hypothèses. En conditions naturelles, les plantes sont soumises à des vents dont la fréquence moyenne se situe entre 1 et 5 Hz (Rodriguez *et al.*, 2008). La dynamique d'ouverture/fermeture des canaux mécanosensibles de type MscS-like pourrait expliquer un phénomène potentiel de désensibilisation dans cette gamme de fréquences. Dans notre cas, nous appliquons des fréquences de l'ordre de 10^{-5} Hz. A l'aide de notre dispositif expérimental, nous pouvons difficilement appliquer plus d'une sollicitation par minute. Toutefois, des espacements courts de cet ordre permettraient de tester plus directement le rôle du système de perception dans l'acclimatation et d'éliminer les processus qui nécessitent une mise en place plus longue. On pourrait alors comparer les mécanismes d'acclimatation lors de l'application de ces deux types de fréquences.

D'après les résultats obtenus dans le chapitre 3, la diminution de l'expression des gènes mécanosensibles qui suit une deuxième sollicitation mécanique appliquée 24h après la première n'est pas totale mais réduite. Les niveaux d'expression observés lors de l'application de flexions successives toutes les 24h restent faibles mais constants et plus forts que le niveau de base pour trois des quatre gènes. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que seuls les tissus

nouvellement formés possèdent la capacité de percevoir la deuxième flexion ou que les cellules déjà sollicitées une fois retrouvent progressivement leur sensibilité. Les expériences réalisées avec des pas de temps variés entre deux flexions montrent que cette désensibilisation dure plusieurs jours et que le recouvrement du niveau normal d'induction de l'expression des gènes est progressif. Le niveau d'expression faible et constant des gènes lors de flexions journalières peut s'expliquer par l'existence d'inhibiteurs potentiels ayant une durée de vie longue. Ces inhibiteurs, entretenus par les flexions successives, permettraient de réguler la réponse de croissance. Pour d'autres stress abiotiques, certains suggèrent l'existence de mécanismes épigénétiques pour expliquer ce phénomène de « mémorisation » pouvant persister plusieurs jours après l'application d'un premier stress (Bruce *et al.*, 2007). Cependant, très peu d'informations sont disponibles concernant le rôle potentiel de phénomènes épigénétiques dans le cas des sollicitations mécaniques.

Compte tenu des résultats obtenus, différents travaux peuvent être envisagés. Ainsi, une localisation de l'expression des gènes lors de la deuxième flexion à l'aide de plantes transgéniques transformées avec des constructions contenant le promoteur de *PtaZFP2* contrôlant l'expression d'un gène GUS ou une immunolocalisation à l'aide d'anticorps spécifiques de *PtaZFP2* pourraient être réalisées. Une approche transcriptomique globale, cherchant à comparer les acteurs moléculaires dont l'expression est modifiée après une flexion et deux flexions, pourrait également être intéressante.

IV- Quelle est la fonction biologique de PtaZFP2 ?

4.1- PtaZFP2 : un facteur de transcription ?

Comme nous l'avons vu dans la synthèse bibliographique, différentes études menées sur des protéines C2H2-ZFP, homologues à *PtaZFP2*, isolées chez d'autres plantes ont montré leur rôle de facteur de transcription. Deux types de motifs sont essentiels à cette activité. Les motifs QALGGH situés au niveau des doigts de zinc permettent une fixation spécifique des protéines sur la séquence d'ADN (Takatsuji et Matsumoto, 1996 ; Yoshioka *et al.*, 2001). Le motif L/F DLN L/F ou motif EAR (ERF-associated amphiphilic repression) a été retrouvé chez de nombreuses protéines ERF et C2H2-ZFP (Kazan, 2006) appartenant au même groupe

de classification C1 que PtaZFP2 (Englbrecht *et al.*, 2004). Ce motif EAR confère une capacité de répression aux protéines qui le contiennent. Kazan (2006) propose, quant à lui, deux rôles majeurs pour les protéines contenant un motif EAR. Le premier rôle, qui paraît peu probable dans le cas de PtaZFP2, serait une inactivation des gènes de défense en absence de tout stress. Le deuxième rôle potentiel serait un contrôle de l'activation des gènes de réponse aux stress afin d'éviter tout dommage aux plantes.

L'analyse de la séquence protéique de PtaZFP2 a mis en évidence la présence de ces différents motifs conservés entre protéines de ce type, notamment deux motifs QALGGH et un motif L/F DLN L/F (Martin *et al.*, 2009). PtaZFP2 possède donc les motifs essentiels à une activité de type facteur de transcription.

Il faut noter cependant, que PtaZFP2 contient également une région hydrophobe riche en leucine (L-box) qui pourrait être impliquée dans des liaisons protéine-protéine. Or, les travaux de Gamsjaeger et ses collaborateurs (2007) ont montré que certains types de doigts de zinc permettent également une liaison avec des ARNs ou des protéines. Cependant, jusqu'à présent aucune étude n'a mis en évidence de telles interactions en ce qui concerne les protéines C2H2-ZFP du groupe C1 auquel appartient PtaZFP2.

La fonction de facteur de transcription de PtaZFP2 reste encore à démontrer. Actuellement, la protéine est en cours de production dans *E. coli*. Différents travaux ayant montré la reconnaissance de motifs d'ADN de type AGT par ces protéines, la réalisation d'un gel retard pourrait permettre de vérifier l'existence d'une telle interaction. On pourrait également utiliser la technique de simple hybride pour isoler les promoteurs sur lesquels PtaZFP2 se fixe.

4.2- Rôle de PtaZFP2 dans la réponse des plantes à une flexion

D'après les premiers résultats obtenus dans le chapitre 4, les plantes transgéniques qui surexpriment *PtaZFP2* présentent différentes modifications physiologiques : une diminution de la croissance longitudinale dans la partie apicale et une augmentation de la rigidité des tissus dans la partie basale, partie ayant terminé son allongement mais présentant une croissance en diamètre active. Cependant, les études menées sur l'anatomie des tiges n'ont montré aucune différence entre les plantes sauvages et les plantes surexprimant *PtaZFP2*. Les mesures de croissance en diamètre en continu à l'aide des LVDT, en absence de sollicitation et suite à une flexion n'ont également montré aucun effet de la surexpression de *PtaZFP2*.

Ces résultats expérimentaux semblent indiquer que le gène *PtaZFP2* n'intervient pas dans le contrôle ou la régulation de la croissance secondaire.

L'augmentation de la rigidité d'un tissu peut provenir de deux origines : augmentation de la quantité de tissu ou modification des propriétés de la paroi. La surexpression de *PtaZFP2* n'entraîne pas de modifications de la croissance en diamètre, donc pas d'augmentation de la quantité de tissu. Cependant, elle induit une augmentation de la valeur du module d'élasticité, donc des modifications de la paroi. Ces dernières peuvent correspondre à une augmentation de son épaisseur et/ou à des modifications de sa composition ultrastructurale. Dans les coupes anatomiques, nous n'avons observé aucune variation quantitative entre les tissus des tiges de plantes sauvages ou ceux des tiges de plantes transgéniques. Il serait donc intéressant de réaliser une observation à plus haute résolution de coupes de tiges afin de voir si les fibres de bois des peupliers transformés présentent une paroi plus épaisse que celles du bois des peupliers témoins.

Le gène *PtaZFP2* pourrait être impliqué dans une augmentation de la rigidité de la paroi en modifiant soit sa teneur en certains composés, soit l'orientation des microfibrilles de cellulose. Typiquement, dans une cellule en elongation, les microfibrilles de cellulose sont orientées transversalement à l'axe d'allongement de la cellule, induisant le renforcement latéral de la paroi. La pression de turgescence est alors canalisée, ce qui aboutit à une elongation cellulaire dans le sens longitudinal (Schopfer, 2006). Cette modification de l'angle des microfibrilles est déterminée par l'orientation des microtubules à la périphérie du cytoplasme des cellules. D'après nos travaux, les plantes surexprimant *PtaZFP2* présentent une induction de l'expression de *PtaACS6*, codant une enzyme de la voie de synthèse de l'éthylène. Or, chez *A. thaliana*, lors de la triple réponse à l'éthylène, l'hormone induit une réorientation des microtubules dans le sens longitudinal. Ce changement déclenche un renforcement de la paroi dans la direction longitudinale et provoque une expansion latérale de la cellule au lieu d'une elongation (Taiz et Zeiger, 2006). Par ailleurs, *PtaZFP2* est induit très fortement par une blessure (Martin *et al.*, 2009), comme le gène *ZAT12* un homologue retrouvé chez *A. thaliana* (Rizhsky *et al.*, 2004). Or, suite à une blessure, une réorientation des microtubules est également observée très rapidement (10 min) au niveau de cellules épidermiques de tiges de pois (Yuan *et al.*, 1994). Une telle hypothèse pourrait expliquer l'augmentation de la rigidité des tissus observée dans les tiges des plantes transgéniques, mais également la diminution de la croissance longitudinale. En effet, exprimé constitutivement dans les zones en croissance, *PtaZFP2* pourrait entraîner une modification des propriétés ultrastructurales de la paroi des cellules en croissance, inhibant ainsi leur elongation.

Afin de vérifier les hypothèses avancées, il serait intéressant de tester si l'expression des facteurs impliqués dans ces modifications de la paroi est effectivement affectée dans les plantes transgéniques. De manière plus générale, une approche globale de type puces à ADN réalisée à partir des plantes transgéniques permettrait de déterminer plus précisément les gènes sous contrôle de ce facteur de transcription.

En conclusion, les travaux de cette thèse présentent un caractère très fortement interdisciplinaire puisqu'ils ont fait appel à de la physiologie, de la biologie moléculaire et de la mécanique des structures. Chaque discipline a pu bénéficier de l'apport des autres. Ainsi, l'utilisation d'un marqueur moléculaire a permis (i) de valider un modèle biophysique de mécanoperception par l'étude d'une réponse très précoce et (ii) de mettre en évidence des phénomènes d'acclimatation très rapides non visibles lors de la réponse de croissance. La quantification de l'état de déformation imposé aux tiges a permis de réaliser une analyse quantitative du phénomène de mécanoperception au niveau moléculaire et d'établir une courbe dose-réponse reliant le niveau d'expression d'un gène à l'état de déformation imposé.

Enfin, ces résultats constituent des bases solides pour appréhender les phénomènes d'acclimatation des plantes au vent en conditions naturelles et ont permis des avancées significatives dans la compréhension des étapes précoces de la mécanoperception chez les plantes.

Références bibliographiques

A

- Agarwal P, Arora R, Ray S, Singh AK, Singh VP, Takatsuji H, Kapoor S, Tyagi AK. 2007.** Genome-wide identification of C2H2 zinc-finger gene family in rice and their phylogeny and expression analysis. *Plant Molecular Biology* **65**(4): 467-485.
- Almeras T, Costes E, Salles JC. 2004.** Identification of biomechanical factors involved in stem shape variability between apricot tree varieties. *Annals of Botany* **93**(4): 455-468.
- Anten NPR, Casado-Garcia R, Pierik R, Pons TL. 2006.** Ethylene sensitivity affects changes in growth patterns, but not stem properties, in response to mechanical stress in tobacco. *Physiologia Plantarum* **128**(2): 274-282.
- Arteca JM, Arteca RN. 1999.** A multi-responsive gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase (ACS6) in mature Arabidopsis leaves. *Plant Molecular Biology* **39**(2): 209-219.

B

- Baluska F, Samaj J, Wojtaszek P, Volkmann D, Menzel D. 2003.** Cytoskeleton-plasma membrane-cell wall continuum in plants. Emerging links revisited. *Plant Physiology* **133**(2): 482-491.
- Baluska F, Hlavacka A. 2005.** Plant formins come of age: something special about cross-walls. *New Phytologist* **168**(3): 499-503.
- Bartel DP. 2004.** MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**(2): 281-297.
- Bateman A, Coin L, Durbin R, Finn RD, Hollich V, Griffiths-Jones S, Khanna A, Marshall M, Moxon S, Sonnhammer ELL, Studholme DJ, Yeats C, Eddy SR. 2004.** The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research* **32**: D138-D141.
- Biddington NL, Dearman AS. 1985.** The effect of mechanically induced stress on the growth of cauliflower, lettuce and celery seedlings. *Annals of Botany* **55**(1): 109-119.
- Biddington NL. 1986.** The effects of mechanically-induced stress in plants - a review. *Plant Growth Regulation* **4**(2): 103-123.
- Biro RL, Hunt ER, Erner Y, Jaffe MJ. 1980.** Thigmomorphogenesis - Changes in Cell-Division and Elongation in the Internodes of Mechanically-Perturbed or Ethrel-Treated Bean-Plants. *Annals of Botany* **45**(6): 655-664.

- Botella JR, Arteca RN, Frangos JA. 1995.** A Mechanical Strain-Induced 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Synthase Gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**(5): 1595-1598.
- Boyer N. 1967.** Modification de la croissance de la tige de bryone (*Bryonia dioica*) à la suite d'irritations tactiles. *Compte Rendu de l'Académie des Sciences de Paris*. **267**: 2114-2117.
- Boyer N, Desbiez MO, Hofinger M, Gaspar T. 1983.** Effect of Lithium on Thigmomorphogenesis in *Bryonia dioica* Ethylene Production and Sensitivity. *Plant Physiology* **72**(2): 522-525.
- Braam J, Davis RW. 1990.** Rain-Induced, Wind-Induced, and Touch-Induced Expression of Calmodulin and Calmodulin-Related Genes in Arabidopsis. *Cell* **60**(3): 357-364.
- Braam J. 1992.** Regulated Expression of the Calmodulin-Related Tch Genes in Cultured Arabidopsis Cells - Induction by Calcium and Heat-Shock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**(8): 3213-3216.
- Braam J, Sistrunk ML, Polisensky DH, Xu W, Purugganan MM, Antosiewicz DM, Campbell P, Johnson KA. 1997.** Plant responses to environmental stress: regulation and functions of the Arabidopsis TCH genes. *Planta* **203**: S35-S41.
- Braam J. 2005.** In touch: plant responses to mechanical stimuli. *New Phytologist* **165**(2): 373-389.
- Bruce TJA, Matthes MC, Napier JA, Pickett JA. 2007.** Stressful "memories" of plants: Evidence and possible mechanisms. *Plant Science* **173**(6): 603-608.

C

- Chehab EW, Eich E, Braam J. 2009.** Thigmomorphogenesis: a complex plant response to mechano-stimulation. *Journal of Experimental Botany* **60**(1): 43-56.
- Chinnusamy V, Ohta M, Kanrar S, Lee BH, Hong XH, Agarwal M, Zhu JK. 2003.** ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in Arabidopsis. *Genes & Development* **17**(8): 1043-1054.
- Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK. 2006.** Gene regulation during cold acclimation in plants. *Physiologia Plantarum* **126**(1): 52-61.

- Choo Y, Klug A. 1997.** Physical basis of a protein-DNA recognition code. *Current Opinion in Structural Biology* **7**(1): 117-125.
- Chotikacharoensuk T, Arteca RN, Arteca JM. 2006.** Use of differential display for the identification of touch-induced genes from an ethylene-insensitive *Arabidopsis* mutant and partial characterization of these genes. *Journal of Plant Physiology* **163**(12): 1305-1320.
- Ciftci-Yilmaz S, Morsy MR, Song LH, Coutu A, Krizek BA, Lewis MW, Warren D, Cushman J, Connolly EL, Mittler R. 2007.** The EAR-motif of the Cys2/His2-type zinc finger protein Zat7 plays a key role in the defense response of *Arabidopsis* to salinity stress. *Journal of Biological Chemistry* **282**(12): 9260-9268.
- Ciftci-Yilmaz S, Mittler R. 2008.** The zinc finger network of plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* **65**(7-8): 1150-1160.
- Cosgrove DJ, Hedrich R. 1991.** Stretch-Activated Chloride, Potassium, and Calcium Channels Coexisting in Plasma-Membranes of Guard-Cells of *Vicia faba* L. *Planta* **186**(1): 143-153.
- Coutand C, Julien JL, Moulia B, Mauget JC, Guitard D. 2000.** Biomechanical study of the effect of a controlled bending on tomato stem elongation: global mechanical analysis. *Journal of Experimental Botany* **51**(352): 1813-1824.
- Coutand C, Moulia B. 2000.** Biomechanical study of the effect of a controlled bending on tomato stem elongation: local strain sensing and spatial integration of the signal. *Journal of Experimental Botany* **51**(352): 1825-1842.
- Coutand C, Dupraz C, Jaouen G, Ploquin S, Adam B. 2008.** Mechanical stimuli regulate the allocation of biomass in trees: Demonstration with young *Prunus avium* trees. *Annals of Botany* **101**(9): 1421-1432.
- Crook MJ, Ennos AR. 1996.** Mechanical differences between free-standing and supported wheat plants, *Triticum aestivum* L. *Annals of Botany* **77**(3): 197-202.
- Crouzet J. 2002.** Caractérisations physiologique et moléculaire de l'effet d'une sollicitation mécanique chez le noyer (*Juglans regia*). DEA.
- Curtis IS, Hanada A, Yamaguchi S, Kamiya Y. 2005.** Modification of plant architecture through the expression of GA 2-oxidase under the control of an estrogen inducible promoter in *Arabidopsis thaliana* L. *Planta* **222**(6): 957-967.

- Curtis MD, Grossniklaus U. 2003.** A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiology* **133**(2): 462-469.
- Cvrckova F, Novotny M, Pickova D, Zarsky V. 2004.** Formin homology 2 domains occur in multiple contexts in angiosperms. *Bmc Genomics* **5**.

D

- Davletova S, Schlauch K, Coutu J, Mittler R. 2005.** The zinc-finger protein Zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in Arabidopsis. *Plant Physiology* **139**(2): 847-856.
- Depege N, Thonat C, Coutand C, Julien JL, Boyer N. 1997.** Morphological responses and molecular modifications in tomato plants after mechanical stimulation. *Plant and Cell Physiology* **38**(10): 1127-1134.
- Devaiah BN, Nagarajan VK, Raghothama KG. 2007.** Phosphate homeostasis and root development in Arabidopsis are synchronized by the zinc finger transcription factor ZAT6. *Plant Physiology* **145**(1): 147-159.
- Ding JP, Pickard BG. 1993.** Mechanosensory Calcium-Selective Cation Channels in Epidermal-Cells. *Plant Journal* **3**(1): 83-110.
- Dinneny JR, Weigel D, Yanofsky MF. 2006.** NUBBIN and JAGGED define stamen and carpel shape in Arabidopsis. *Development* **133**(9): 1645-1655.

E

- Ecker JR. 1995.** The Ethylene Signal-Transduction Pathway in Plants. *Science* **268**(5211): 667-675.
- Elmayan T, Vaucheret H. 1996.** Expression of single copies of a strongly expressed 35S transgene can be silenced post-transcriptionally. *Plant Journal* **9**(6): 787-797.
- Englbrecht CC, Schoof H, Bohm S. 2004.** Conservation, diversification and expansion of C2H2 zinc finger proteins in the *Arabidopsis thaliana* genome. *Bmc Genomics* **5**.
- Erner Y, Biro R, Jaffe MJ. 1980.** Thigmomorphogenesis - Evidence for a Translocatable Thigmomorphogenetic Factor Induced by Mechanical Perturbation of Beans (*Phaseolus vulgaris*). *Physiologia Plantarum* **50**(1): 21-25.

Erner Y, Jaffe MJ. 1983. Thigmomorphogenesis - Membrane Lipid and Protein-Changes in Bean-Plants as Affected by Mechanical Perturbation and Ethrel. *Physiologia Plantarum* **58**(2): 197-203.

F

Fanutti C, Gidley MJ, Reid JSG. 1993. Action of a Pure Xyloglucan Endo-Transglycosylase (Formerly Called Xyloglucan-Specific Endo-(1-4)-Beta-D-Glucanase) from the Cotyledons of Germinated Nasturtium Seeds. *Plant Journal* **3**(5): 691-700.

Fire A. 1999. RNA-triggered gene silencing. *Trends in Genetics* **15**(9): 358-363.

Fournier M, Chanson B, Guitard D, Thibaut B. 1991a. Mechanics of Standing Trees - Modeling a Growing Structure Submitted to Continuous and Fluctuating Loads .1. Analysis of Support Stresses. *Annales Des Sciences Forestieres* **48**(5): 513-525.

Fournier M, Chanson B, Thibaut B, Guitard D. 1991b. Mechanics of Standing Trees - Modeling a Growing Structure Submitted to Continuous and Fluctuating Loads .2. Tridimensional Analysis of Maturation Stresses - Case of Standard Hardwood. *Annales Des Sciences Forestieres* **48**(5): 527-546.

Fournier M, Bailleres H, Chanson B. 1994. Tree biomechanics: growth, cumulative pre-stresses and reorientations. *Biomimetics* **2**: 229-252.

Fournier M, Stokes A, Coutand C, Fourcaud T, Moulia B. 2005. Tree biomechanics and growth strategies in the context of forest functional ecology. In A. Herrel, T. Speck and N. Rowe [eds.], Ecology and biomechanics: a biomechanical approach of the ecology of animals and plants 1-33. CRC Taylor and Francis, Boca Raton, Florida, USA.

Fry SC, Smith RC, Renwick KF, Martin DJ, Hodge SK, Matthews KJ. 1992. Xyloglucan Endotransglycosylase, a New Wall-Loosening Enzyme-Activity from Plants. *Biochemical Journal* **282**: 821-828.

G

Gamsjaeger R, Liew CK, Loughlin FE, Crossley M, Mackay JP. 2007. Sticky fingers: zinc-fingers as protein-recognition motifs. *Trends in Biochemical Sciences* **32**(2): 63-70.

Gartner BL. 1994. Root Biomechanics and Whole-Plant Allocation Patterns - Responses of Tomato Plants to Stem Flexure. *Journal of Experimental Botany* **45**(280): 1647-1654.

- Gechev TS, Van Breusegem F, Stone JM, Denev I, Laloi C. 2006.** Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *Bioessays* **28**(11): 1091-1101.
- Gens JS, Fujiki M, Pickard BG. 2000.** Arabinogalactan protein and wall-associated kinase in a plasmalemmal reticulum with specialized vertices. *Protoplasma* **212**(1-2): 115-134.
- Goodman AM, Ennos AR. 1996.** A comparative study of the response of the roots and shoots of sunflower and maize to mechanical stimulation. *Journal of Experimental Botany* **47**(303): 1499-1507.
- Guharay F, Sachs F. 1984.** Stretch-Activated Single Ion Channel Currents in Tissue-Cultured Embryonic Chick Skeletal-Muscle. *Journal of Physiology-London* **352**(JUL): 685-701.
- Guo HS, Fei JF, Xie Q, Chua NH. 2003.** A chemical-regulated inducible RNAi system in plants. *Plant Journal* **34**(3): 383-392.
- Gus-Mayer S, Naton B, Hahlbrock K, Schmelzer E. 1998.** Local mechanical stimulation induces components of the pathogen defense response in parsley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**(14): 8398-8403.

H

- Hamant O, Heisler MG, Jonsson H, Krupinski P, Uyttewaal M, Bokov P, Corson F, Sahlin P, Boudaoud A, Meyerowitz EM, Couder Y, Traas J. 2008.** Developmental Patterning by Mechanical Signals in Arabidopsis. *Science* **322**(5908): 1650-1655.
- Hamill OP, Martinac B. 2001.** Molecular basis of mechanotransduction in living cells. *Physiological Reviews* **81**(2): 685-740.
- Hamill OP. 2006.** Twenty odd years of stretch-sensitive channels. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* **453**(3): 333-351.
- Haswell ES, Meyerowitz EM. 2006.** MscS-like proteins control plastid size and shape in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology* **16**(1): 1-11.
- Haswell ES, Peyronnet R, Barbier-Brygoo H, Meyerowitz EM, Frachisse JM. 2008.** Two MscS homologs provide mechanosensitive channel activities in the Arabidopsis root. *Current Biology* **18**(10): 730-734.
- Helliwell CA, Wesley SV, Wielopolska AJ, Waterhouse PM. 2002.** High-throughput vectors for efficient gene silencing in plants. *Functional Plant Biology* **29**(10): 1217-1225.

- Herbette S, Lenne C, Leblanc N, Julien JL, Drevet JR, Roeckel-Drevet P. 2002.** Two GPX-like proteins from *Lycopersicon esculentum* and *Helianthus annuus* are antioxidant enzymes with phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and thioredoxin peroxidase activities. *European Journal of Biochemistry* **269**(9): 2414-2420.
- Heuchert JC, Mitchell CA. 1983.** Inhibition of Shoot Growth in Greenhouse-Grown Tomato by Periodic Gyrotory Shaking. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **108**(5): 795-800.
- Huang J, Yang X, Wang MM, Tang HJ, Ding LY, Shen Y, Zhang HS. 2007.** A novel rice C2H2-type zinc finger protein lacking DLN-box/EAR-motif plays a role in salt tolerance. *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression* **1769**(4): 220-227.

I

- Ingber DE. 2003a.** Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. *Journal of Cell Science* **116**(7): 1157-1173.
- Ingber DE. 2003b.** Tensegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks. *Journal of Cell Science* **116**(8): 1397-1408.
- Ingber DE. 2005.** Mechanical control of tissue growth: Function follows form. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(33): 11571-11572.
- Isernia C, Bucci E, Leone M, Zaccaro L, Di Lello P, Digilio G, Esposito S, Saviano M, Di Blasio B, Pedone C, Pedone PV, Fattorusso R. 2003.** NMR structure of the single QALGGH zinc finger domain from the *Arabidopsis thaliana* SUPERMAN protein. *Chembiochem* **4**(2-3): 171-180.

J

- Jaffe MJ. 1973.** Thigmomorphogenesis. The response of plant growth and development to mechanical stimulation. *Planta* **114**: 143-157.
- Jaffe MJ. 1976.** Thigmomorphogenesis - Detailed Characterization of Response of Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) to Mechanical Stimulation. *Zeitschrift Fur Pflanzenphysiologie* **77**(5): 437-453.
- Jaffe MJ, Leopold AC. 1984.** Callose Deposition During Gravitropism of Zea-Mays and *Pisum sativum* and Its Inhibition by 2-Deoxy-D-Glucose. *Planta* **161**(1): 20-26.

- Jaffe MJ, Telewski FW, Cooke PW. 1984.** Thigmomorphogenesis - on the Mechanical-Properties of Mechanically Perturbed Bean-Plants. *Physiologia Plantarum* **62**(1): 73-78.
- Jaffe MJ, Forbes S. 1993.** Thigmomorphogenesis - the Effect of Mechanical Perturbation on Plants. *Plant Growth Regulation* **12**(3): 313-324.
- Jaffe MJ, Leopold AC, Staples RC. 2002.** Thigmo responses in plants and fungi. *American Journal of Botany* **89**(3): 375-382.
- Janmey PA. 1998.** The cytoskeleton and cell signaling: Component localization and mechanical coupling. *Physiological Reviews* **78**(3): 763-781.
- Johnson KA, Sistrunk ML, Polisensky DH, Braam J. 1998.** *Arabidopsis thaliana* responses to mechanical stimulation do not require ETR1 or EIN2. *Plant Physiology* **116**(2): 643-649.

K

- Kam J, Gresshoff PM, Shorter R, Xue GP. 2008.** The Q-type C2H2 zinc finger subfamily of transcription factors in *Triticum aestivum* is predominantly expressed in roots and enriched with members containing an EAR repressor motif and responsive to drought stress. *Plant Molecular Biology* **67**(3): 305-322.
- Kazan K. 2006.** Negative regulation of defence and stress genes by EAR-motif-containing repressors. *Trends in Plant Science* **11**(3): 109-112.
- Kern KA, Ewers FW, Telewski FW, Koehler L. 2005.** Mechanical perturbation affects conductivity, mechanical properties and aboveground biomass of hybrid poplars. *Tree Physiology* **25**(10): 1243-1251.
- Kim JC, Lee SH, Cheong YH, Yoo CM, Lee SI, Chun HJ, Yun DJ, Hong JC, Lee SY, Lim CO, Cho MJ. 2001.** A novel cold-inducible zinc finger protein from soybean, SCOF-1, enhances cold tolerance in transgenic plants. *Plant Journal* **25**(3): 247-259.
- Klee CB, Vanaman TC. 1982.** Calmodulin. *Advances in Protein Chemistry* **35**: 213-321.
- Knight MR, Smith SM, Trewavas AJ. 1992.** Wind-Induced Plant Motion Immediately Increases Cytosolic Calcium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**(11): 4967-4971.
- Koncz C, Schell J. 1986.** The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Gen Genet* **204**: 383-396.

- Krichevsky A, Gutgarts H, Kozlovsky SV, Tzfira T, Sutton A, Sternglanz R, Mandel G, Citovsky V. 2007.** C2H2 zinc finger-SET histone methyltransferase is a plant-specific chromatin modifier. *Developmental Biology* **303**(1): 259-269.
- Kubo K, Sakamoto A, Kobayashi A, Rybka Z, Kanno Y, Nakagawa H, Nishino T, Takatsuji H. 1998.** Cys(2)/His(2) zinc-finger protein family of petunia: evolution and general mechanism of target-sequence recognition. *Nucleic Acids Research* **26**(2): 608-615.
- Kung C. 2005.** A possible unifying principle for mechanosensation. *Nature* **436**(7051): 647-654.
- Kutschera U, Bergfeld R, Schopfer P. 1987.** Cooperation of Epidermis and Inner Tissues in Auxin-Mediated Growth of Maize Coleoptiles. *Planta* **170**(2): 168-180.
- Kutschera U, Kohler K. 1992.** Turgor and Longitudinal Tissue Pressure in Hypocotyls of *Helianthus annuus* L. *Journal of Experimental Botany* **43**(257): 1577-1581.

L

- Lang I, Barton DA, Overall RL. 2004.** Membrane-wall attachments in plasmolysed plant cells. *Protoplasma* **224**(3-4): 231-243.
- Larson PR. 1965.** Stem forms of young *Larix* as influenced by wind and pruning. *Forest Science* **11**: 412-424.
- Leblanc-Fournier N, Coutand C, Crouzet J, Brunel N, Lenne C, Moulia B, Julien JL. 2008.** Jr-ZFP2, encoding a Cys2/His2-type transcription factor, is involved in the early stages of the mechano-perception pathway and specifically expressed in mechanically stimulated tissues in woody plants. *Plant Cell and Environment* **31**(6): 715-726.
- Lee D, Polisensky DH, Braam J. 2005.** Genome-wide identification of touch- and darkness-regulated Arabidopsis genes: a focus on calmodulin-like and XTH genes. *New Phytologist* **165**(2): 429-444.
- Legue V, Blancaflor E, Wymer C, Perbal G, Fantin D, Gilroy S. 1997.** Cytoplasmic free Ca²⁺ in Arabidopsis roots changes in response to touch but not gravity. *Plant Physiology* **114**(3): 789-800.
- Leplé JC, Brasileiro ACM, Michel MF, Delmotte F, Jouanin L. 1992.** Transgenic Poplars - Expression of Chimeric Genes Using 4 Different Constructs. *Plant Cell Reports* **11**(3): 137-141.

Lippuner V, Cyert MS, Gasser CS. 1996. Two classes of plant cDNA clones differentially complement yeast calcineurin mutants and increase salt tolerance of wild-type yeast. *Journal of Biological Chemistry* **271**(22): 12859-12866.

M

Martin L, Leblanc-Fournier N, Azri W, Lenne C, Henry C, Coutand C, Julien JL. 2009. Characterization and expression analysis under bending and other abiotic factors of PtaZFP2, a poplar gene encoding a Cys2/His2 zinc finger protein *Tree Physiology* **29**: 125-136.

Maruyama K, Sakuma Y, Kasuga M, Ito Y, Seki M, Goda H, Shimada Y, Yoshida S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2004. Identification of cold-inducible downstream genes of the Arabidopsis DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems. *Plant Journal* **38**(6): 982-993.

Mattanovich D, Rüker F, Da Câmara Machado A, Laimer M, Regner F, Steinkellner H, Himmler G, Katinger H. 1989. Efficient transformation of *Agrobacterium* spp. by electroporation. *Nucleic Acid Research* **17**: 6747.

Matzke MA, Matzke AJM. 1995. How and Why Do Plants Inactivate Homologous (Trans)Genes. *Plant Physiology* **107**(3): 679-685.

McCormack E, Braam J. 2003. Calmodulins and related potential calcium sensors of Arabidopsis. *New Phytologist* **159**(3): 585-598.

McDougall GJ, Fry SC. 1990. Xyloglucan Oligosaccharides Promote Growth and Activate Cellulase - Evidence for a Role of Cellulase in Cell Expansion. *Plant Physiology* **93**(3): 1042-1048.

Mellerowicz EJ, Immerzeel P, Hayashi T. 2008. Xyloglucan: The Molecular Muscle of Trees. *Annals of Botany* **102**(5): 659-665.

Meng SX, Lieffers VJ, Reid DEB, Rudnicki M, Silins U, Jin M. 2006. Reducing stem bending increases the height growth of tall pines. *Journal of Experimental Botany* **57**(12): 3175-3182.

Michelot A, Guerin C, Huang SJ, Ingouff M, Richard S, Rodiuc N, Staiger CJ, Blanchoin L. 2005. The formin homology 1 domain modulates the actin nucleation and bundling activity of Arabidopsis FORMIN1. *Plant Cell* **17**(8): 2296-2313.

- Miller J, McLachlan AD, Klug A. 1985.** Repetitive Zinc-Binding Domains in the Protein Transcription Factor Iiia from *Xenopus* Oocytes. *Embo Journal* **4**(6): 1609-1614.
- Mitchell CA. 1996.** Recent advances in plant response to mechanical stress: Theory and application. *Hortscience* **31**(1): 31-35.
- Mittler R, Kim Y, Song LH, Coutu J, Coutu A, Ciftci-Yilmaz S, Lee H, Stevenson B, Zhu JK. 2006.** Gain- and loss-of-function mutations in *Zat10* enhance the tolerance of plants to abiotic stress. *Febs Letters* **580**(28-29): 6537-6542.
- Mori IC, Schroeder JI. 2004.** Reactive oxygen species activation of plant Ca^{2+} channels. A signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction. *Plant Physiology* **135**(2): 702-708.
- Mouliat B, Combes C. 2004.** Thigmomorphogenetic acclimation of plants to moderate winds greatly affects height structure in field-grown alfalfa (*Medicago sativa* L.), an indeterminate herb. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **137**: 77.
- Mouliat B, Coutand C, Lenne C. 2006.** Posture control and skeletal mechanical acclimation in terrestrial plants: Implications for mechanical modeling of plant architecture. *American Journal of Botany* **93**(10): 1477-1489.
- Murashige T, Skoog F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* **15**: 473-492.

N

- Nakagawa H, Ferrario S, Angenent GC, Kobayashi A, Takatsuji H. 2004.** The petunia ortholog of Arabidopsis SUPERMAN plays a distinct role in floral organ morphogenesis. *Plant Cell* **16**(4): 920-932.
- Nakagawa H, Jiang CJ, Sakakibara H, Kojima M, Honda I, Ajioka H, Nishijima T, Koshioka M, Homma T, Mander LN, Takatsuji H. 2005.** Overexpression of a petunia zinc-finger gene alters cytokinin metabolism and plant forms. *Plant Journal* **41**(4): 512-523.
- Neel PL, Harris RW. 1971.** Motion induced inhibition of elongation and induction of dormancy in liquidambar. *Science* **173**: 58-59.

- Nelson CM, Jean RP, Tan JL, Liu WF, Sniadecki NJ, Spector AA, Chen CS. 2005.** Emergent patterns of growth controlled by multicellular form and mechanics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(33): 11594-11599.
- Niklas KJ. 1994.** Interspecific Allometries of Critical Buckling Height and Actual Plant Height. *American Journal of Botany* **81**(10): 1275-1279.
- Nishikubo N, Awano T, Banasiak A, Bourquin V, Ibatullin F, Funada R, Brumer H, Teeri TT, Hayashi T, Sundberg B, Mellerowicz EJ. 2007.** Xyloglucan endo-transglycosylase (XET) functions in gelatinous layers of tension wood fibers in poplar - A glimpse into the mechanism of the balancing act of trees. *Plant and Cell Physiology* **48**(6): 843-855.
- Nishitani K, Tominaga R. 1992.** Endoxyloglucan Transferase, a Novel Class of Glycosyltransferase That Catalyzes Transfer of a Segment of Xyloglucan Molecule to Another Xyloglucan Molecule. *Journal of Biological Chemistry* **267**(29): 21058-21064.

O

- Ohta M, Matsui K, Hiratsu K, Shinshi H, Ohme-Takagi M. 2001.** Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. *Plant Cell* **13**(8): 1959-1968.
- Orozco-Cardenas M, Ryan CA. 1999.** Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**(11): 6553-6557.
- Osler GHR, West PW, Downes GM. 1996.** Effects of bending stress on taper and growth of stems of young Eucalyptus regnans trees. *Trees-Structure and Function* **10**(4): 239-246.

P

- Patterson MR. 1992.** Role of Mechanical Loading in Growth of Sunflower (*Helianthus annuus*) Seedlings. *Journal of Experimental Botany* **43**(252): 933-939.
- Pauw B, Hilliou FAO, Martin VS, Chatel G, de Wolf CJF, Champion A, Pre M, van Duijn B, Kijne JW, van der Fits L, Memelink J. 2004.** Zinc finger proteins act as transcriptional repressors of alkaloid biosynthesis genes in *Catharanthus roseus*. *Journal of Biological Chemistry* **279**(51): 52940-52948.

- Pavletich NP, Pabo CO. 1991.** Zinc Finger DNA Recognition - Crystal-Structure of a Zif268-DNA Complex at 2.1-Å. *Science* **252**(5007): 809-817.
- Pierik R, Sasidharan R, Voesenek L. 2007.** Growth control by ethylene: Adjusting phenotypes to the environment. *Journal of Plant Growth Regulation* **26**(2): 188-200.
- Pilate G, Chabbert B, Cathala B, Yoshinaga A, Leple JC, Laurans F, Lapierre C, Ruel K. 2004.** Lignification and tension wood. *Comptes Rendus Biologies* **327**(9-10): 889-901.
- Polisensky DH, Braam J. 1996.** Cold-shock regulation of the arabidopsis TCH genes and the effects of modulating intracellular calcium levels. *Plant Physiology* **111**(4): 1271-1279.
- Porter BW, Zhu YJ, Webb DT, Christopher DA. 2009.** Novel thigmomorphogenetic responses in *Carica papaya*: touch decreases anthocyanin levels and stimulates petiole cork outgrowths. *Annals of Botany* **103**(6): 847-858.
- Pruyn ML, Ewers BJ, Telewski FW. 2000.** Thigmomorphogenesis: changes in the morphology and mechanical properties of two *Populus* hybrids in response to mechanical perturbation. *Tree Physiology* **20**(8): 535-540.
- Py C, de Langre E, Moulia B, Hémon P. 2005.** Measurement of wind-induced motion of crop canopies from digital video images. *Agricultural and Forest Meteorology* **130**: 223-236.

R

- Reddy ASN. 2001.** Calcium: silver bullet in signaling. *Plant Science* **160**(3): 381-404.
- Rizhsky L, Davletova S, Liang HJ, Mittler R. 2004.** The zinc finger protein Zat12 is required for cytosolic ascorbate peroxidase 1 expression during oxidative stress in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* **279**(12): 11736-11743.
- Roberts DM, Harmon AC. 1992.** Calcium-Modulated Proteins - Targets of Intracellular Calcium Signals in Higher-Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **43**: 375-414.
- Rodriguez M, De Langre E, Moulia B. 2008.** A scaling law for the effects of architecture and allometry on tree vibration modes suggests a biological tuning to modal compartmentalization. *American Journal of Botany* **95**(12): 1523-1537.
- Rogers SO, Bendich AJ. 1985.** Extraction of DNA from Milligram Amounts of Fresh, Herbarium and Mummified Plant-Tissues. *Plant Molecular Biology* **5**(2): 69-76.

S

- Sack FD. 1991.** Plant Gravity Sensing. *International Review of Cytology-a Survey of Cell Biology* **127**: 193-252.
- Sakai H, Medrano LJ, Meyerowitz EM. 1995.** Role of Superman in Maintaining Arabidopsis Floral Whorl Boundaries. *Nature* **378**(6553): 199-203.
- Sakamoto A, Minami M, Huh GH, Iwabuchi M. 1993.** The Putative Zinc-Finger Protein Wzf1 Interacts with a Cis-Acting Element of Wheat Histone Genes. *European Journal of Biochemistry* **217**(3): 1049-1056.
- Sakamoto H, Araki T, Meshi T, Iwabuchi M. 2000.** Expression of a subset of the Arabidopsis Cys(2)/His(2)-type zinc-finger protein gene family under water stress. *Gene* **248**(1-2): 23-32.
- Sakamoto H, Maruyama K, Sakuma Y, Meshi T, Iwabuchi M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2004.** Arabidopsis Cys2/His2-type zinc-finger proteins function as transcription repressors under drought, cold, and high-salinity stress conditions. *Plant Physiology* **136**(1): 2734-2746.
- Saura-Valls M, Faure R, Ragas S, Piens K, Brumer H, Teeri TT, Cottaz S, Driguez H, Planas A. 2006.** Kinetic analysis using low-molecular mass xyloglucan oligosaccharides defines the catalytic mechanism of a Populus xyloglucan endotransglycosylase. *Biochemical Journal* **395**: 99-106.
- Schopfer P. 2006.** Biomechanics of plant growth. *American Journal of Botany* **93**(10): 1415-1425.
- Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Taji T, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K. 2002.** Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant Journal* **31**(3): 279-292.
- Sistrunk ML, Antosiewicz DM, Purugganan MM, Braam J. 1994.** Arabidopsis Tch3 Encodes a Novel Ca²⁺ Binding-Protein and Shows Environmentally-Induced and Tissue-Specific Regulation. *Plant Cell* **6**(11): 1553-1565.
- Sivaguru M, Fujiwara T, Samaj J, Baluska F, Yang ZM, Osawa H, Maeda T, Mori T, Volkmann D, Matsumoto H. 2000.** Aluminum-induced 1 → 3-beta-D-glucan inhibits

- cell-to-cell trafficking of molecules through plasmodesmata. A new mechanism of aluminum toxicity in plants. *Plant Physiology* **124**(3): 991-1005.
- Slesak I, Slesak H, Libik M, Miszalski Z. 2008.** Antioxidant response system in the short-term post-wounding effect in *Mesembryanthemum crystallinum* leaves. *Journal of Plant Physiology* **165**(2): 127-137.
- Smith NA, Singh SP, Wang MB, Stoutjesdijk PA, Green AG, Waterhouse PM. 2000.** Gene expression - Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* **407**(6802): 319-320.
- Smith RC, Fry SC. 1991.** Endotransglycosylation of Xyloglucans in Plant-Cell Suspension-Cultures. *Biochemical Journal* **279**: 529-535.
- Soga K, Wakabayashi K, Kamisaka S, Hoson T. 2006.** Hypergravity induces reorientation of cortical microtubules and modifies growth anisotropy in azuki bean epicotyls. *Planta* **224**(6): 1485-1494.
- Soga K, Wakabayashi K, Kamisaka S, Hoson T. 2007.** Effects of hypergravity on expression of XTH genes in azuki bean epicotyls. *Physiologia Plantarum* **131**(2): 332-340.
- Stokes A, Fitter AH, Coutts MP. 1995.** Responses of Young Trees to Wind and Shading - Effects on Root Architecture. *Journal of Experimental Botany* **46**(290): 1139-1146.
- Sugano S, Kaminaka H, Rybka Z, Catala R, Salinas J, Matsui K, Ohme-Takagi M, Takatsuji H. 2003.** Stress-responsive zinc finger gene ZPT2-3 plays a role in drought tolerance in petunia. *Plant Journal* **36**(6): 830-841.

\mathcal{T}

- Taiz L, Zeiger E. 2006.** Ethylen. In L. Taiz and E. Zeiger [eds.], Plant physiology, 4th edition. 571-591. Sinauer, Sunderland, Masschussets, USA.
- Takatsuji H, Mori M, Benfey PN, Ren L, Chua NH. 1992.** Characterization of a Zinc Finger DNA-Binding Protein Expressed Specifically in Petunia Petals and Seedlings. *Embo Journal* **11**(1): 241-249.
- Takatsuji H, Matsumoto T. 1996.** Target sequence recognition by separate type Cys(2)/His(2) zinc finger proteins in plants. *Journal of Biological Chemistry* **271**(38): 23368-23373.
- Takatsuji H. 1998.** Zinc-finger transcription factors in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* **54**(6): 582-596.

- Takatsuji H. 1999.** Zinc-finger proteins: the classical zinc finger emerges in contemporary plant science. *Plant Molecular Biology* **39**(6): 1073-1078.
- Takeda T, Furuta Y, Awano T, Mizuno K, Mitsuishi Y, Hayashi T. 2002.** Suppression and acceleration of cell elongation by integration of xyloglucans in pea stem segments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(13): 9055-9060.
- Tatsuki M, Mori H. 1999.** Rapid and transient expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase isogenes by touch and wound stimuli in tomato. *Plant and Cell Physiology* **40**(7): 709-715.
- Telewski FW, Jaffe MJ. 1986a.** Thigmomorphogenesis - Anatomical, Morphological and Mechanical Analysis of Genetically Different Sibs of *Pinus taeda* in Response to Mechanical Perturbation. *Physiologia Plantarum* **66**(2): 219-226.
- Telewski FW, Jaffe MJ. 1986b.** Thigmomorphogenesis - Field and Laboratory Studies of *Abies fraseri* in Response to Wind or Mechanical Perturbation. *Physiologia Plantarum* **66**(2): 211-218.
- Telewski FW, Pruyn ML. 1998.** Thigmomorphogenesis: a dose response to flexing in *Ulmus americana* seedlings. *Tree Physiology* **18**(1): 65-68.
- Telewski FW. 2006.** A unified hypothesis of mechanoperception in plants. *American Journal of Botany* **93**(10): 1466-1476.
- Thonat C, Boyer N, Penel C, Courduroux JC, Gaspar T. 1993.** Cytological Indication of the Involvement of Calcium and Calcium-Related Proteins in the Early Responses of *Bryonia dioica* to Mechanical Stimulus. *Protoplasma* **176**(3-4): 133-137.
- Tretner C, Huth U, Hause B. 2008.** Mechanostimulation of *Medicago truncatula* leads to enhanced levels of jasmonic acid. *Journal of Experimental Botany* **59**(10): 2847-2856.
- Trewavas A, Knight M. 1994.** Mechanical Signaling, Calcium and Plant Form. *Plant Molecular Biology* **26**(5): 1329-1341.
- Tuskan GA, DiFazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev I, Hellsten U, Putnam N, Ralph S, Rombauts S, Salamov A, Schein J, Sterck L, Aerts A, Bhalerao RR, Bhalerao RP, Blaudez D, Boerjan W, Brun A, Brunner A, Busov V, Campbell M, Carlson J, Chalot M, Chapman J, Chen GL, Cooper D, Coutinho PM, Couturier J, Covert S, Cronk Q, Cunningham R, Davis J, Degroove S, Dejardin A, Depamphilis C, Detter**

J, Dirks B, Dubchak I, Duplessis S, Ehlting J, Ellis B, Gendler K, Goodstein D, Gribskov M, Grimwood J, Groover A, Gunter L, Hamberger B, Heinze B, Helariutta Y, Henrissat B, Holligan D, Holt R, Huang W, Islam-Faridi N, Jones S, Jones-Rhoades M, Jorgensen R, Joshi C, Kangasjarvi J, Karlsson J, Kelleher C, Kirkpatrick R, Kirst M, Kohler A, Kalluri U, Larimer F, Leebens-Mack J, Leple JC, Locascio P, Lou Y, Lucas S, Martin F, Montanini B, Napoli C, Nelson DR, Nelson C, Nieminen K, Nilsson O, Pereda V, Peter G, Philippe R, Pilate G, Poliakov A, Razumovskaya J, Richardson P, Rinaldi C, Ritland K, Rouze P, Ryaboy D, Schmutz J, Schrader J, Segerman B, Shin H, Siddiqui A, Sterky F, Terry A, Tsai CJ, Uberbacher E, Unneberg P, Vahala J, Wall K, Wessler S, Yang G, Yin T, Douglas C, Marra M, Sandberg G, Van de Peer Y, Rokhsar D. 2006. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* **313**(5793): 1596-1604.

U-V-W-X

- Uehara Y, Takahashi Y, Berberich T, Miyazaki A, Takahashi H, Matsui K, Ohme-Takagi M, Saitoh H, Terauchi R, Kusano T. 2005. Tobacco ZFT1, a transcriptional repressor with a Cys(2)/His(2) type zinc finger motif that functions in spermine-signaling pathway. *Plant Molecular Biology* **59**(3): 435-448.
- Van Breusegem F, Vranova E, Dat JF, Inze D. 2001. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science* **161**(3): 405-414.
- Vogel JT, Zarka DG, Van Buskirk HA, Fowler SG, Thomashow MF. 2005. Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of Arabidopsis. *Plant Journal* **41**(2): 195-211.
- White PJ, Broadley MR. 2003. Calcium in plants. *Annals of Botany* **92**(4): 487-511.
- Wright AJ, Knight H, Knight MR. 2002. Mechanically stimulated TCH3 gene expression in Arabidopsis involves protein phosphorylation and EIN6 downstream of calcium. *Plant Physiology* **128**(4): 1402-1409.
- Xu W, Purugganan MM, Polisensky DH, Antosiewicz DM, Fry SC, Braam J. 1995. Arabidopsis Tch4, Regulated by Hormones and the Environment, Encodes a Xyloglucan Endotransglycosylase. *Plant Cell* **7**(10): 1555-1567.

y-z

- Yahraus T, Chandra S, Legendre L, Low PS. 1995.** Evidence for a Mechanically Induced Oxidative Burst. *Plant Physiology* **109**(4): 1259-1266.
- Yi KX, Guo CQ, Chen D, Zhao BB, Yang B, Ren HY. 2005.** Cloning and functional characterization of a formin-like protein (AtFH8) from Arabidopsis. *Plant Physiology* **138**(2): 1071-1082.
- Yoshioka K, Fukushima S, Yamazaki T, Yoshida M, Takatsuji H. 2001.** The plant zinc finger protein ZPT2-2 has a unique mode of DNA interaction. *Journal of Biological Chemistry* **276**(38): 35802-35807.
- Young IM, Montagu K, Conroy J, Bengough AG. 1997.** Mechanical impedance of root growth directly reduces leaf elongation rates of cereals. *New Phytologist* **135**(4): 613-619.
- Yuan M, Shaw PJ, Warn RM, Lloyd CW. 1994.** Dynamic Reorientation of Cortical Microtubules, from Transverse to Longitudinal, in Living Plant-Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**(13): 6050-6053.
- Zuo JR, Niu QW, Chua NH. 2000.** An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant Journal* **24**(2): 265-273.

Annexes

Annexe 1

Solution nutritive

Macro-éléments :

		Molarité (mM) solution finale
Chlorure de sodium	NaCl	0.09
Sulfate de magnésium	MgSO₄, 7H₂O	0.55
Sulfate d'ammonium	(NH₄)₂SO₄	0.27
Nitrate de calcium	Ca(NO₃)₂, 4H₂O	0.73
Nitrate de potassium	KNO₃	1.00
Dihydrogénophosphate de potassium	KH₂PO₄	0.55
Di-potassium hydrogéné-phosphate	K₂HPO₄	0.55

Micro-éléments :

		Molarité (μM) solution finale
Molybdate d'ammonium	(NH₄)₂MoO₄	0.51
Sulfate de manganèse	MnSO₄, H₂O	3.61
Sulfate de zinc	ZnSO₄, 7H₂O	3.06
Acide borique	H₃BO₃	9.06
Sulfate de cuivre	CuSO₄	1.23
		concentration finale
Fer	Fe-EDDHA	0.0002%

Annexe 2

Séquences des oligonucléotides utilisés pour le clonage des différents inserts dans les vecteurs de transformation

	Nom	Séquences oligonucléotidiques
Construction PMDC7 PtaZFP2	<i>PENTR PtaZFP2 S</i>	5' -CAC CTT ACC ATG AAG AGA GAT-3'
	<i>PENTR PtaZFP2 AS</i>	5' -TGT CCA AAC TCC AAA TTA AGG-3'
Construction PMDC7 JrZFP2	<i>PENTR JrZFP2 S</i>	5' -CAC CTA CGT CCT TTT TAC ATG-3'
	<i>PENTR JrZFP2 AS</i>	5' -TCA AAT CAT CAA ACG AAG ATG G-3'
Construction pHg8 RNAi Spe	<i>PENTR RNAi S</i>	5' -CAC CGC CTA ATA ATG TTG ATA-3'
	<i>PENTR RNAi AS</i>	5' -GGT CAA GTT CAA ATC CAA G-3'
Construction pX7 RNAi Spe	<i>RNAi Spe X</i>	5' -CTC GAG GCC TAA TAA TGT TGA TAC CAC-3'
	<i>RNAi Spe H</i>	5' -AAG CTT GGC CAA GCT CAA ATC CAA G-3'
	<i>RNAi Spe P</i>	5' -AAC TAG GCC TAA TAA TGT TGA TAC CAC-3'
	<i>RNAi Spe E</i>	5' -GAA TTC GGC CAA GCT CAA ATC CAA G-3'
Construction pX7 RNAi NSpe	<i>RNAi NSpe X</i>	5' -CTC GAG CTA GTT ATA GAC CAG CAG C-3'
	<i>RNAi NSpe H</i>	5' -AAG CTT AGC ACA GAA CTC TCT TGC T-3'
	<i>RNAi NSpe P</i>	5' -AAC TAG CTA GTT ATA GAC CAG CAG C-3'
	<i>RNAi NSpe E</i>	5' -GAA TTC AGC ACA GAA CTC TCT TGC T-3'
Construction PMDC7 GUS	<i>PENTR GUS S</i>	5' -CAC CAT GTT ACG TCC TGT AGA-3'
	<i>PENTR GUS AS</i>	5' -TCA TTG TTT GCC TCC CTG C-3'

Annexe 3

Extraction d'ADN génomique

- ♣ Broyer quelques mg de tissus dans de l'azote liquide (éviter toute décongélation du matériel végétal).
- ♣ Déposer la poudre dans un tube de 2 ml.
- ♣ Ajouter 900 µl de tampon d'extraction additionné de 2% de β-mercaptoéthanol, homogénéiser au vortex.
- ♣ Incuber 30 min à 65°C en agitant de temps en temps.
- ♣ Ajouter un volume de chloroforme/alcool isoamylique (24/1). Homogénéiser en dégazant.
- ♣ Centrifuger 10 min à 13 500 rpm et à 4°C.
- ♣ Prélever le surnageant et réaliser un deuxième lavage au chloroforme/alcool isoamylique (24/1).
- ♣ Prélever le surnageant et précipiter les ADN avec 1.5 volume d'isopropanol en incubant à -20°C sur la nuit.
- ♣ Centrifuger 20 min à 13 500 rpm et à 4°C.
- ♣ Eliminer le surnageant et laver 2 fois le culot avec 500 µl d'éthanol 70% glacé.
- ♣ Reprendre le culot dans 50 µl d'H₂O stérile additionnée de RNaseA (50 µg/ml final) et incuber 1h à 37°C.

► Tampon d'extraction CTAB

CTAB 2% (p/v)
 PVP 2% (p/v)
 Tris-HCl pH8 100 mM
 EDTA pH8 25 mM
 NaCl 2 M

Dissoudre le tout dans de l'H₂O stérile en chauffant. Mélanger et autoclaver.
 Ajouter 2% de β-mercaptoéthanol juste avant utilisation.

Annexe 4

Inclusion en résine LR White

♣ **Fixation dans FAA à 4°C** : fixation sous vide au départ jusqu'à ce que le matériel plonge au fond du tube (si possible !). Casser le vide lentement puis les échantillons sont fixés en présence de FAA neuf durant 5 à 6 h à 4°C. (Pas de rinçage).

♣ **Déshydratation du matériel végétal**

- Ethanol 50 %, 30 min, à 4°C.
- Ethanol 70 %, 30 min, à 4°C.
- Ethanol 80 %, 30 min, à 4°C.
- Ethanol 95 %, 30 min, à 4°C.
- Ethanol 100 %, 30 min, à 4°C.
- Ethanol 100 %, 30 min, à 4°C.
- Ethanol 100 %, une nuit à 4°C.

♣ **Imprégnation**

- Ethanol 100 % 2/3 : Résine 1/3 : 2 x 30 min à 4°C.
- Ethanol 100 % 1/2 : Résine 1/2 : 30 min à 4°C.
- Ethanol 100 % 1/3 : Résine 2/3 : 30 min à 4 °C.
- Résine LR White pure : 1 h à 4°C.
- Résine renouvelée et laissée ainsi pendant une nuit (ou plus) à 4°C.

♣ **Inclusion finale dans gélule**

Inclusion finale dans des gélules : "gelatin capsule" (Euromedex, ≠ tailles possible) :

- Faire un trou à l'aide d'une aiguille de seringue au sommet de la gélule (couvercle)
- Mettre un peu de résine au fond de la gélule.
- Déposer le matériel végétal.
- Remplir la gélule de résine doucement de façon à laisser le moins possible d'air.
- Placer alors les gélules à 55°C pour polymérisation (au moins 24 h, rajouter de la résine si nécessaire).

► Solutions à préparer

- Fixateur FAA : à préparer extemporanément (mettre les différents ingrédients séparément à 4°C)

- Formaldéhyde 3,7 % (v/v),
- Ethanol 50 % (v/v),
- **Acide acétique 5 % (v/v).**

- Tampon phosphate 0,1 M pH 7,2 : (à conserver à 4°C)

Préparer les solutions suivantes :

- Solution Na_2HPO_4 (142 g.mol^{-1}) 1 M : 14,2 g pour 100 ml H_2O ,
- Solution NaH_2PO_4 (120 g.mol^{-1}) 1 M : 12 g pour 100 ml H_2O ,

Coloration bleu de toluidine

- ♣ Incuber 2 min dans du bleu de toluidine 0,25% (p/v dans H_2O).
- ♣ Rincer à l'eau.
- ♣ Déposer sur lame.
- ♣ Laisser sécher les coupes et monter entre lame et lamelle dans de l'Eukitt.

Coloration Safranine bleu astra

- ♣ Incuber les coupes pendant 6 min dans de l'eau de javel 2,4 M pour vider le contenu cellulaire, puis rincer les coupes à l'eau.
- ♣ Réaliser des bains successifs :
 - 5 min dans éthanol 25%,
 - 5 min dans éthanol 50 %,
 - 5 min dans éthanol 70 %,
 - 3 min dans solution de **safranine à 1 % dans éthanol 70 %**,
 - rinçage dans éthanol 100 %,
 - 3 min 30 dans solution de **bleu astra à 1 % dans éthanol 100 %**,
- ♣ Déposer les coupes sur lame.
- ♣ Laisser sécher les coupes et monter entre lame et lamelle dans de l'Eukitt.

Résumé

En conditions naturelles, les plantes sont soumises en permanence à des stimuli mécaniques internes et externes. Pour se développer dans ces conditions, les végétaux doivent pouvoir percevoir les sollicitations mécaniques et acclimater leur croissance. Chez la tomate, la quantification des signaux mécaniques et des réponses physiologiques suite à une sollicitation a conduit à un modèle intégratif de la mécanoperception. Ce dernier suppose que chaque petit morceau de tissu génère un signal proportionnel à la déformation perçue et que ces signaux s'additionnent pour donner une réponse à l'échelle de la plante entière. Cependant, les hypothèses proposées nécessitaient d'être testées pour des réponses locales et chez d'autres espèces.

Le premier objectif de ce travail interdisciplinaire était de valider le modèle chez le peuplier (*Populus tremula x alba*) au niveau de deux réponses locales : la croissance en diamètre et le niveau d'expression d'un gène mécanosensible primaire codant un facteur de transcription, *PtaZFP2*. Nous avons ainsi pu démontrer, grâce à la mise en place d'un dispositif de flexion original, que l'application d'une flexion transitoire induit une augmentation rapide de la quantité relative de transcrits de *PtaZFP2* ainsi qu'une augmentation de la croissance en diamètre des tiges pendant $4,8 \pm 2,7$ jours. Une corrélation linéaire entre les sommes de déformations appliquées et ces deux réponses locales a été mise en évidence, validant ainsi les hypothèses du modèle « somme des déformations » pour des réponses et des plantes différentes.

Nous avons également testé l'effet de l'application de faibles fréquences de sollicitation ($< 10^{-5}$ Hz) sur l'expression de différents gènes mécanosensibles et sur la réponse de croissance en diamètre. Les résultats obtenus montrent que les plantes s'acclimatent rapidement aux sollicitations mécaniques et qu'il y a une période de désensibilisation.

Enfin, pour comprendre le rôle biologique de *PtaZFP2*, des peupliers transgéniques le surexprimant ont été produits. Ces plantes présentent une inhibition de leur croissance longitudinale de l'ordre de 10% par rapport aux témoins.

Mots clefs: acclimatation, biomécanique, croissance en diamètre, facteur de transcription putatif C2H2, flexion, gènes *TOUCH*, mécanoperception, *Populus*, stimulus mécanique.

Abstract

During their growth, plants are continuously subjected to numerous internal and external mechanical stimuli. In order to grow in these conditions, plants need to perceive and acclimate their growth to these mechanical loadings. To better characterize such process, the quantification of both mechanical signal and physiological responses to a single loading was necessary. In tomato, an integrative biomechanical model of mechanosensing was available. It assumes that each little piece of tissue generates a little signal proportional to the perceived strain and that these signals sum up to trigger the plant response. However, these hypotheses remained to be tested with local responses and in other species.

The first aim of this interdisciplinary work was to check the validity of this model in poplar (*Populus tremula x alba*) on two local responses: the diameter growth and the expression level of a primary mechanosensitive transcription factor gene, *PtaZFP2*. Using an original experimental bending device enabling to control the level of applied strain and to monitor diameter growth continuously, we demonstrated that a single stem bending induced rapidly the relative abundance of *PtaZFP2* and increased the stem diameter growth for 4.8 ± 2.7 days. Both local responses were shown to be linearly correlated to the sum of applied strains. The hypotheses of the “sum-of-strains” model of mechanosensing were thus validated on different responses and plant species.

The effect of low frequency of bending ($<10^{-5}$ Hz) was tested on gene expression and diameter growth response. The results indicate that plants acclimate rapidly to mechanical loadings and that a desensitisation period of few days occurred after a single bending.

To understand the biological role of *PtaZFP2*, transgenic poplars overexpressing *PtaZFP2* were produced. These plants show about 10% inhibition of their longitudinal growth.

Key words: acclimation, bending, biomechanics, C2H2 zinc finger putative transcription factor, diameter growth, mechanical stimulus, mechanosensing, *Populus*, *TOUCH* genes.

